

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/018038

International filing date: 03 December 2004 (03.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-407834
Filing date: 05 December 2003 (05.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 03 February 2005 (03.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

08.12.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 2 月 5 日
Date of Application:

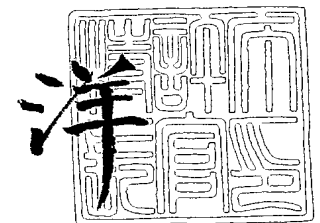
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 4 0 7 8 3 4
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 4 0 7 8 3 4]

出 願 人
Applicant(s): 学 校 法 人 東 海 大 学
 官 田 敏 男
 黒 川 清

2 0 0 5 年 1 月 2 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 190610
【提出日】 平成15年12月 5日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61P 13/12
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県伊勢原市桜台 2 丁目 1 6 - 2 5 エクセル伊勢原 1 0 2 号
 【氏名】 宮田 敏男
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都新宿区市谷柳町 4 9 市ヶ谷ヒルズ 4 0 1
 【氏名】 黒川 清
【特許出願人】
 【識別番号】 000125369
 【住所又は居所】 東京都渋谷区富ヶ谷 2 丁目 2 8 番 4 号
 【氏名又は名称】 学校法人東海大学
【特許出願人】
 【識別番号】 597142376
 【住所又は居所】 神奈川県伊勢原市桜台 2 丁目 1 6 - 2 5 エクセル伊勢原 1 0 2 号
 【氏名又は名称】 宮田 敏男
【特許出願人】
 【識別番号】 597142387
 【住所又は居所】 東京都新宿区市谷柳町 4 9 市ヶ谷ヒルズ 4 0 1
 【氏名又は名称】 黒川 清
【代理人】
 【識別番号】 100062144
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 青山 葆
 【電話番号】 06-6949-1261
 【ファクシミリ番号】 06-6949-0361
【選任した代理人】
 【識別番号】 100067035
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 岩崎 光隆
 【電話番号】 06-6949-1261
 【ファクシミリ番号】 06-6949-0361
【選任した代理人】
 【識別番号】 100064610
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 中嶋 正二
 【電話番号】 06-6949-1261
 【ファクシミリ番号】 06-6949-0361
【選任した代理人】
 【識別番号】 100072730
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 小島 一晃
 【電話番号】 06-6949-1261
 【ファクシミリ番号】 06-6949-0361

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013262

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 特許請求の範囲 1

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

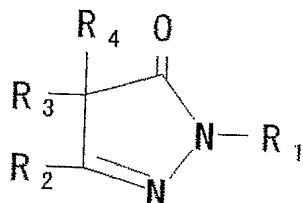
【請求項 1】

遊離形または塩形の 1-置換または非置換-3-置換または非置換-2-ピラゾリン-5-オンの 4 位に、ビタミン B 6 分子の結合を妨げる置換基（ビタミン B 6 分子自体に由来するものを含む）を導入した化合物またはその転位体を有効成分とする、蛋白修飾物生成抑制剤。

【請求項 2】

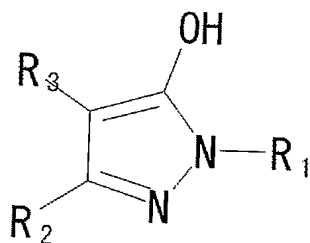
有効成分である化合物が、遊離形または塩形の式 (I) :

【化 1】



または式 (II) :

【化 2】



[式中、R1 は置換または非置換の芳香環基であり、R2、R3 および R4 はそれぞれ水素原子または 1 価の有機基であるか、または R2 と R3 は両者合して縮合環を形成するか、もしくは R3 と R4 は両者合して 2 価の有機基を表す。ただし、R3 と R4 が共に水素原子であることはない。]

で示される化合物から選択される、請求項 1 記載の蛋白修飾物生成抑制剤。

【請求項 3】

R1 で表される芳香環基が、4 個を越えることのないヘテロ原子を含むことがある、20 個を越えることのない環構成原子を有する炭素環または異項環の芳香環基であって、3 つを越えない置換基を有することがあるものである、請求項 2 記載の蛋白質修飾物生成抑制剤。

【請求項 4】

R2、R3 または R4 で表される 1 価の有機基が、それぞれ独立して、炭素数 30 個を越えない、鎖状または環状の脂肪族、脂環式または芳香族炭化水素基であって、3 つを越えない置換基を有することのあるものであるか、またはハロゲン基、ニトロ基、アミノ基、ヒドロキシ基、チオール基、カルボキシ基、カルボキシ（低級）アルキル基、低級アルコキシカルボニル基、ホルミル基、低級アルカノイル基、低級アルキルアミノ基、ジ（低級）アルキルアミノ基、低級アルカノイルアミノ基、アリール（低級）アルカノイル基、アリールオキシアミノ基、スルホン酸基または 3～7 員ヘテロ環基であって、置換基を有することのあるものである、請求項 2 または 3 記載の蛋白修飾物生成抑制剤。

【請求項 5】

R2 と R3 が両者合して形成する縮合環が、5～6 員炭素飽和環であって、置換基を有することもあるものである、請求項 2 または 3 記載の蛋白修飾物生成抑制剤。

【請求項 6】

R3 と R4 が両者合して形成する 2 価の有機基が、フェニルメチレン、フェニルアルケニルメチレン、キノリニルメチレン、フラニルメチレン、ジアズリルメチレン、アミノメチレン、ジ（低級）アルキルアミノメチレン、ピリジルメチレンおよびチオフェニルメチレン

ンから選択されたものであって、置換基を有することもあるものである、請求項 2 または 3 記載の蛋白修飾物生成抑制剤。

【請求項 7】

置換基が、低級アルキル基、低級アルケニル基、低級アルコキシ基、低級アルケニルオキシ基、低級アルカノイル基、ハロ（低級）アルキル基、カルボキシ基、低級アルコキシカルボニル基、カルボキシ（低級）アルキル基、ハロゲン基、ニトロ基、アミノ基、低級アルキルアミノ基、ジ（低級）アルキルアミノ基、低級アルカノイルアミノ基、ヒドロキシ基、チオール基、ヒドロキシスルホニル基、アミノスルホニル基、アリール（低級）アルカノイル基、アリールオキシアミノ基、アリール基、アリール（低級）アルキル基、シクロ（低級）アルキル基、シクロ（低級）アルケニル基、シクロ（低級）アルキル（低級）アルキル基および 3～7 員ヘテロ環基から選択されたものである、請求項 3～6 のいずれか記載の蛋白修飾物生成抑制剤。

【請求項 8】

式 (I) において、R 1 がフェニル基、R 2 がメチル基、R 3 と R 4 が合して 3-ヒドロキシ-5-ヒドロキシメチル-2-メチルピリジン-4-イルメチレン基である、請求項 2 記載の蛋白修飾物生成抑制剤。

【請求項 9】

式 (II) において、R 1 がフェニル基、R 2 がメチル基、R 3 が 6-メチル-1, 3-ジヒドロフロ [3, 4-c] ピリジン-7-オール基である、請求項 2 記載の蛋白修飾物生成抑制剤。

【請求項 10】

蛋白修飾物が、AGEs、ALEs およびこれらの組合せよりなる群から選択されるものである、請求項 1～9 のいずれか記載の蛋白修飾物生成抑制剤。

【請求項 11】

蛋白修飾物が AGEs である、請求項 10 記載の蛋白修飾物生成抑制剤。

【請求項 12】

AGEs が ペントシジンである、請求項 11 記載の蛋白修飾物生成抑制剤。

【請求項 13】

請求項 1～12 のいずれか記載の蛋白修飾物生成抑制剤を含む、腎組織保護剤。

【請求項 14】

請求項 1～12 のいずれか記載の蛋白修飾物生成抑制剤を含む、腹膜透析液。

【請求項 15】

請求項 1～12 のいずれか記載の蛋白修飾物生成抑制剤を含む、血液透析液。

【請求項 16】

請求項 1～12 のいずれか記載の蛋白修飾物生成抑制剤を液体試料と接触させる工程を含む、液体試料のカルボニル化合物含有量を低減させる方法。

【請求項 17】

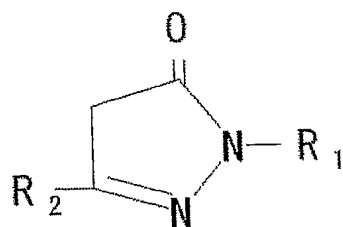
請求項 1～12 のいずれか記載の蛋白修飾物生成抑制剤を患者の血液または腹膜透析液と接触させる工程を含む、蛋白修飾物の生成抑制方法。

【請求項 18】

蛋白修飾物生成抑制剤として有用な、遊離形または塩形の 1-置換または非置換-3-置換または非置換-2-ピラゾリン-5-オンの 4 位に、ビタミン B 6 分子の結合を妨げる置換基（ビタミン B 6 分子自体に由来するものを含む）を導入することを特徴とする、当該蛋白修飾物生成抑制剤に起因するビタミン B 6 欠乏症を抑制する方法。

【請求項 19】

1-置換または非置換-3-置換または非置換-2-ピラゾリン-5-オンが、式 (III) :



〔式中、R₁は水素原子または置換または非置換の芳香環基であり、R₂は水素原子または1価の有機基である。〕

で表される化合物から選択されるものである、請求項18記載の方法。

【請求項20】

4位に導入される、ビタミンB₆分子の結合を妨げる置換基が有機基から選択されるものである、請求項18または19記載の方法。

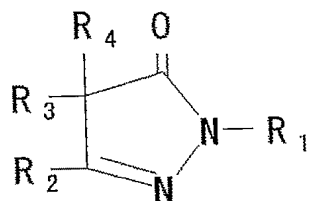
【請求項21】

遊離形または塩形の1-置換または非置換-3-置換または非置換-2-ピラゾリン-5-オンの4位に、ビタミンB₆分子の結合を妨げる置換基（ビタミンB₆分子自体に由来するものを含む）を導入した化合物またはその分子内転位体。

【請求項22】

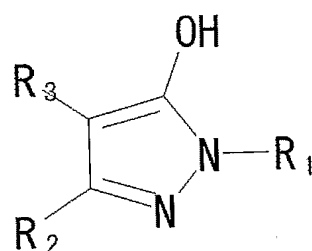
遊離形または塩形の式（I）：

【化3】



または式（II）：

【化4】



〔式中、R₁は置換または非置換の芳香環基であり、R₂、R₃およびR₄はそれぞれ水素原子または1価の有機基であるか、またはR₂とR₃は両者合して縮合環を形成するか、もしくはR₃とR₄は両者合して2価の有機基を表す。ただし、R₃とR₄が共に水素原子であることはない。〕

で示される化合物。

【請求項23】

式（I）において、R₁がフェニル基、R₂がメチル基、R₃とR₄が合して3-ヒドロキシ-5-ヒドロキシメチル-2-メチルピリジン-4-イルメチレン基である、請求項22記載の化合物。

【請求項24】

式（II）において、R₁がフェニル基、R₂がメチル基、R₃が6-メチル-1, 3-ジヒドロフロ[3, 4-c]ピリジン-7-オール基である、請求項22記載の化合物。

【書類名】明細書

【発明の名称】蛋白修飾物生成抑制剤

【技術分野】

【0001】

この発明は、蛋白修飾物生成抑制剤、特に非酵素的条件下にカルボニル化合物と反応することによって生じる糖化最終産物（Advanced Glycation End Products、以下、「AGEs」と称する）、脂質過酸化最終産物（Advanced Lipoxidation End Products、以下、「ALEs」と称する）等の蛋白修飾物の生成を抑制する薬剤に関する。

【背景技術】

【0002】

糖化反応（グリケーション）とは、ペプチドや蛋白質等のアミノ基と還元糖等のカルボニル基との非酵素的反応から始まる一連の反応（メイラード反応（非特許文献1参照））をいい、初期段階と後期段階に大別することができる。初期段階は糖の濃度と反応時間とに依存する可逆反応であり、前記アミノ基と前記カルボニル基とが非酵素的に反応してシッフ塩基を生成し、さらにアマドリ転位によりアマドリ化合物を形成する。

【0003】

後期段階では初期段階で生成したアマドリ化合物が非可逆的に脱水、縮合、環状化、酸化、断片化、重合、転位等を受け、最終的に AGEsと呼ばれる蛋白修飾物を形成する。糖の自動酸化等により、3-デオキシグルコソン（以下、「3-DG」と称する）、グリオキサール（以下、「GO」と称する）およびメチルグリオキサール（以下、「MGO」と称する）等の反応性の高いジカルボニル化合物が生成するが、これらのカルボニル化合物も蛋白と反応し、多くの場合蛋白質のリジン残基やアルギニン残基等が修飾されたAGEsを生成する。

【0004】

また、酸化ストレス下では、生体内に豊富に存在する糖、脂質、アミノ酸等は酸化反応等により、反応性の高いカルボニル化合物へと変化する。その結果生じる、GO、MGO、アラビノース、グリコールアルデヒドなどの化合物はAGEsの前駆物質となる。また、アスコルビン酸の酸化により生成するデヒドロアスコルビン酸もAGEsの前駆物質となる。これらの前駆物質はいずれもカルボニル基を有しており、蛋白質のアミノ基と非酵素的に反応してシッフ塩基を生成してAGEsを形成する（非特許文献2参照）。

【0005】

一方、酸化ストレス下では脂質過酸化も進行し、マロンジアルデヒド、ヒドロキシノネナールおよびアクロレインのような、様々なカルボニル化合物が形成される（非特許文献3参照）。これらのカルボニル化合物も蛋白質のアミノ基等と反応し、マロンジアルデヒド修飾リジンやヒドロキシノネナール修飾物等のALEsと呼ばれる蛋白修飾物を形成する（非特許文献2参照）。

【0006】

更に、セリンやスレオニンなどのアミノ酸も酸化によりアクロレイン、GOなどのカルボニル化合物が生成し、蛋白修飾物を形成する（非特許文献4参照）。多くのカルボニル化合物は酸化的経路で生成されるが、3-DGのように非酸化的経路を経て生成されるカルボニル化合物も存在する。

【0007】

公知のAGEs生成経路として、1) シッフ塩基、アマドリ化合物から3-DGを経由する経路、2) シッフ塩基が酸化的にグリコールアルデヒド→アルキルイミンへ変化し、アルドアミンを経てAGEsに至る経路、3) アルドアミンがグリオキサールモノアルキルイミンを経てAGEsに至る経路、4) アマドリ化合物から2,3-エンジオールを経て生成されるMGOを中間体とする経路、5) その他等がある。

【0008】

最近、AGEsのひとつであるカルボキシメチルリジンが不飽和脂肪酸の脂質酸化反応の結果生じるGOによっても生成することが明らかになり、糖化・酸化反応と脂質酸化反応が共通の基盤で起こっていると考えられる。

【0009】

以上のように、糖、脂質、アミノ酸およびアスコルビン酸から酸化的、非酸化的経路により生成されたカルボニル化合物は、蛋白を非酵素的に修飾して最終的にAGEsやALEs等の蛋白修飾物を形成するに至る。特に、複数の反応経路を経て生成されたカルボニル化合物により蛋白修飾反応が亢進している状態をカルボニル過剰による蛋白修飾、すなわち、カルボニルストレスと呼んでいる。

【0010】

公知のAGEsとしては、ペントシジン（非特許文献5参照）、クロスリン（非特許文献6参照）、X1（フルオロリンク）、ピロピリジン（非特許文献7参照）、ピラリン（非特許文献8参照）、カルボキシメチルリジン（非特許文献9参照）、イミダゾロン化合物（非特許文献10参照）、カルボキシエチルリジン（非特許文献11参照）、MGOダイマー（非特許文献12参照）、GOダイマー（非特許文献13参照）、イミダゾリジン（非特許文献14参照）およびアルグピリミジン（非特許文献15参照）等が知られている。

【0011】

現在クローニングされているAGEs受容体として、RAGE（非特許文献16参照）、マクロファージスカベンジャー受容体クラスA（非特許文献17参照）、ガレクチン3（非特許文献18参照）、OST-48および80K-H等がある（非特許文献17参照）。

【0012】

血管組織においてAGEsがRAGE（免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞膜貫通型蛋白質）に結合すると、細胞内で活性酸素が生成し、p21ras/MAPK経路が活性化され（非特許文献19参照）、これにより転写因子NF- κ B活性化が誘導され、VCAM-1等の血管障害関連因子の発現が誘導されることが報告されている（非特許文献20参照）。また、AGEsはRAGEを介して、微小血管の内皮細胞の増殖を制御し、恒常性維持に重要な役割を果たしている周皮細胞の増殖を抑制するとともに、毒性効果を発揮することが報告されている（非特許文献21参照）。

【0013】

さらに、AGEsはRAGEを介して、微小血管の内皮細胞に直接的に作用し血管新生を促進すること、PGI₂の産生を阻害して血栓傾向となること（非特許文献22参照）が報告されている。その他、AGEsやALEs等の生理活性として、メサンギウム細胞の基質産生の亢進、単球遊走能の亢進、マクロファージからの炎症性サイトカインの放出、滑膜細胞のコラゲナーゼ産生促進、破骨細胞の活性化、血管平滑筋の増殖作用、血小板凝集の促進、NO活性とその平滑筋弛緩反応の抑制が報告されている（非特許文献23参照）。

【0014】

AGEsが関与する疾患として、1）糖尿病合併症である腎症（非特許文献24参照）、神経障害（非特許文献25参照）、網膜症（非特許文献21参照）および白内障、2）動脈硬化（非特許文献26参照）、3）透析合併症である透析アミロイドーシス（非特許文献27参照）および腹膜透析患者における腹膜硬化症、4）中枢神経疾患であるアルツハイマー病（非特許文献28参照）、ピック病およびパーキンソン病、5）リウマチ性関節炎（非特許文献29参照）、6）日光弾性線維症、7）老化、8）腎不全（非特許文献30参照）等が知られている。その他、糖尿病の場合、血管内皮由来の血管拡張がAGEsによって障害されること（非特許文献31参照）、AGEsが腎硬化を促進させること（非特許文献32参照）等が報告されている。

【0015】

以上のことから、AGEsを初めとする蛋白修飾物は、直接的にまたは受容体を介して生体に悪影響を与えることが明らかとなっている。

【0016】

一方、腎機能が低下するに従って、血中のAGEsの濃度が上昇することが知られている。腎機能低下により、分子量5kDa以下と考えられるカルボニル化合物は体内に蓄積する。ペントシジンやピラリン等の場合、遊離型も存在するが、血清アルブミン等の蛋白結合型が大部分を占めている（非特許文献33参照）。また、血中ペントシジン濃度は糸球体濾過

機能の影響を強く受けるという報告がある（非特許文献34参照）。

【0017】

この様に、AGEsはその大部分が腎において処理され、健康時には血中濃度は低く保たれているが、腎機能が低下すると尿毒症毒素（uremic toxin）として慢性の生物活性をもたらすようになる。

【0018】

透析療法によって遊離型のものは除去されるが、蛋白結合型のものや分子内架橋を形成するものは除去することは困難である（非特許文献35参照）。従って、腎不全期間の経過と共に蛋白修飾物の生体内蓄積量は増加する。また、生体内で糖が反応する基本的な過程以外に食品中から供給される遊離型AGEsや、生体内で既に形成されたアマトリ化合物などから形成される活性の強い3-DG、GO、MGOなどの中間体が次々に蛋白と反応し、AGEsの産生を促進することが認められている。また、血液は透析膜と接触することによって、補体系や白血球の活性化などの様々な影響を受け、フリーラジカルの産生亢進へとつながる等、透析療法そのものによる酸化の亢進も存在し、AGEs生成の一因となっている。

【0019】

ゆえに、透析療法での対策としては透析導入の初期からこれらの遊離型物質の除去を図り、結合型のAGEs形成を極力抑制することが重要であり、上記のように結合型のAGEsを透析療法によって除去することは困難であるので、透析療法では蛋白修飾物の生成を抑制する薬物の開発が希求されている。

【0020】

また、腎機能に起因するばかりではなく、腎不全に伴う抗酸化防御機構の低下も蛋白修飾物の蓄積に関与していると考えられる。腎不全患者では、血中還元型グルタチオンに対する酸化型グルタチオンの上昇（非特許文献36参照）、グルタチオン依存酵素群の活性低下、保存期腎不全血漿グルタチオンペルオキシダーゼの低下（非特許文献37参照）、全血中グルタチオンの低下（非特許文献38参照）、ならびに血漿セレン濃度の低下に対する血漿スーパーオキシドジスムターゼの活性上昇（非特許文献39参照）といった抗酸化能の不均衡が示唆されている（非特許文献40参照）。

【0021】

また、一般に慢性腎不全の患者では、高血糖の有無に関わらず血中や組織中に反応性の高いカルボニル化合物やAGEsが著しく蓄積していることが報告されている（非特許文献41参照）。腎不全においては、非酵素的化学反応によりカルボニル化合物が高負荷の状態（カルボニルストレス）となり、蛋白質修飾が亢進される病態が存在しており、糖・脂質からカルボニル化合物が生成され蛋白質を修飾するためであると考えられる（非特許文献42参照）。

【0022】

ゆえに、様々な要因によって生じる蛋白修飾物の生成を抑制することが、組織障害の軽減につながり、AGEs等の蛋白修飾物質が関与する病態を予防および治療することができる。

。

【0023】

慢性腎不全患者に行われる透析には、血液透析と腹膜透析がある。腹膜透析の場合、血中の老廃物は腹膜を通して腹膜透析液中に排泄される。高浸透圧の腹膜透析液（グルコース、イコデキストリンまたはアミノ酸等を含有する）は、腎不全患者の血中に蓄積した反応性の高いカルボニル化合物（例えば腎不全患者の血中に酸化ストレスに伴って蓄積する、炭水化物に由来するカルボニル化合物（アラビノース、GO、MGO、3-DG）、アスコルビン酸に由来するカルボニル化合物（デヒドロアスコルビン酸）、脂質に由来するカルボニル化合物（ヒドロキシノネナール、マロンジアルデヒド、アクロレイン））を、腹膜を介して腹腔内の腹膜透析液中に集める作用がある。

【0024】

また、腹膜透析液の滅菌や保存中に、反応性の高いカルボニル化合物（3-DG、5-ヒドロキシメチルフルフラール、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、GO、MGO、レプリン酸

、フルフラール、アラビノースなどのカルボニル化合物)が腹膜透析液中に生成することが知られている(非特許文献43参照)。

【0025】

そのため腹膜透析液中の前記カルボニル化合物濃度は上昇し、蛋白修飾物質の生成が亢進する。その結果、腹膜の機能が低下し、除水能の低下や腹膜硬化症への進展に参与すると考えられる。(非特許文献44参照)。

【0026】

実際に腹膜透析患者においては、導入されたグルコースによって腹腔内がカルボニルストレス状態となっていることは、内皮および中皮の免疫組織学的検討から証明されている(非特許文献45参照)。

【0027】

この様に、透析患者においてもカルボニル化合物による蛋白修飾物の生成が腹膜の形態学的変化およびこれに伴う機能(除水能)の低下の原因となっていることが推測されており、その改善方法の提供が求められている。

【0028】

以上の事実と腎不全をはじめとする種々の病態を考え合わせると、カルボニル化合物蓄積がAGEs産生亢進の原因のひとつであると考えられ(非特許文献46参照)、AGEsの産生を抑制することが、AGEsが関連する病態に対し有効であると考えられる。

【0029】

代表的なAGEs生成阻害薬としてアミノグアニジンがある。アミノグアニジンはグルコース、シッフ塩基やアマドリ生成物から生成される3-DGなどのジカルボニル化合物と反応してチアゾリンを形成することによってAGEs生成を阻害すると考えられている。糖尿病モデル動物を用いた解析では、糖尿病性腎症(非特許文献47参照)、網膜症(非特許文献48参照)および白内障(非特許文献49参照)の進展を遅延させる効果が確認されている。

。

【0030】

他に、この種に属する化合物としてピリドキサミン誘導体(ピリドリジン)がある。また、OPB-9195((±)2-イソプロピリデンヒドラゾノ-4-オキソ-チアゾリジン-5-イルアセトアニリド)はヒドラジンの窒素原子がカルボニル基と反応して安定な構造を形成し、遊離または蛋白に結合した反応性カルボニルを捕捉することにより(非特許文献50参照)、in vitroでAGEsのみならずALEsの生成も抑制する。メトホルミンやブホルミン等のビグアナイド化合物もカルボニル化合物を捕捉できるため、(非特許文献51参照)AGEs生成阻害薬として利用できる可能性がある。さらに、AGEsの特徴である架橋を切断するタイプのAGEs阻害剤、アマドリ化合物を分解する酵素(amadoriase)等の提案もされている。

【0031】

一方、カルボニル化合物を消去することにより、AGEsやALEsの生成を阻害する可能性も検討されている。カルボニル化合物の消去にはいくつかの酵素や酵素的経路が存在し、例えばアルドース還元酵素、アルデヒドデヒドロゲナーゼやグリオキサラーゼ経路が挙げられるが(非特許文献52参照)還元型グルタチオン(GSH)やNAD(P)Hなどのレドックス補酵素はこれらの経路の活性に重要な要素である。

【0032】

これらの消去系の低下は同時に多数のカルボニル化合物の上昇につながる。MGO、GOなどのカルボニル化合物はGSHのチオール基と反応し、結果的に酵素グリオキサラーゼにより代謝される。NAD(P)Hはグルタチオン還元酵素を活性化し、GSHレベルを上昇させる。すなわち、細胞内レドックス機構の不均衡によるGSHおよびNAD(P)Hの低下によりカルボニル化合物の消去系が阻害され、AGEsやALEsの蓄積につながると考えられる。また、糖尿病においては、高血糖によりポリオール経路が活性化され、NAD(P)HやGSHが低下し、結果的にカルボニル化合物の消去系が低下することが示唆される。

【0033】

前述したようにGSHおよびNAD(P)Hなどのチオール濃度の低下がカルボニル化合物消去の

低下につながり、結果としてAGEsやALEsを形成する原因のひとつとなっているとすれば、チオールレベルを上昇させることによりカルボニル化合物を減少できる可能性がある。これには、GSH、システイン、アセチルシステイン等によりチオール基を補充する方法、ビタミンEやユビキノール等によりGSH需要を低下させる方法、アルドース還元酵素阻害薬等によりポリオール系を阻害する方法が提案されている。さらに、アミノグアニジン、ピリドキサミン、ヒドラジン、ビッグアニド化合物およびSH基含有化合物を用いて、カルボニル化合物をトラップさせる方法も提案されている（特許文献1参照）。

【0034】

以上詳細に述べたように、AGEsおよびALEsの生成を阻害することが、これらに関連する病態を予防または治療できる方法である。

【0035】

【特許文献1】国際公開WO00/10606 号

【非特許文献1】メイラード, エル, シー (Maillard, L. C.) ら著, 「コンプテス・レンダス・ヘブドマダイレス・デス・シンシズ・デ・ラ・ソサイエテ・デ・バイオリジー (Compt. Rend. Soc. Biol.)」, (フランス), 1912年, 第72巻, p599

【非特許文献2】ミヤタ, ティー (Miyata, T.) ら著, 「キドニー・インターナショナル (Kidney Int.)」, (アメリカ), 1999年, 第55巻, p389-399

【非特許文献3】エステルバウアー, エイチ (Esterbauer, H.) ら著, 「フリーラジカル・バイオリジー・アンド・メディスン (Free Radic. Biol. Med.)」, (アメリカ), 1991年, 第11巻, p81-128

【非特許文献4】アンダーソン, エム, エム (Anderson, M. M.) ら著, 「ジャーナル・オブ・クリニカル・インベステイゲーション (J. Clin. Invest.)」, (アメリカ), 1997年, 第99巻, p424-432

【非特許文献5】セル, ディー, アール (Sell, D. R.) ら著, 「ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)」, (アメリカ), 1989年, 第264巻, p21597-21602

【非特許文献6】ナカムラ, ケイ (Nakamura, K.) ら著, 「ジャーナル・オブ・ザ・ケミカル・ソサエティー・ケミカル・コミュニケーションズ (J. Chem. Soc. Chem. Commun.)」, (イギリス), 1992年, 第15巻, p992-994

【非特許文献7】ハヤセ, エフ (Hayase, F.) ら著, 「バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー (Biosci. Biotech. Biochem.)」, (日本), 1994年, 第58巻, p1936-1937

【非特許文献8】ヌジョロジー, エフ, ジー (Njoroge, F. G.) ら著, 「カルボハイドレート・リサーチ (Carbohydr. Res.)」, (オランダ), 1987年, 第167巻, p211-220

【非特許文献9】アーメッド, エム, ユー (Ahmed, M. U.) ら著, 「ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)」, (アメリカ), 1986年, 第261巻, p4889-4894

【非特許文献10】ハヤセ, エフ (Hayase, F.) ら著, 「バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー (Biosci. Biotech. Biochem.)」, (日本), 1995年, 第59巻, p1407-1411

【非特許文献11】アーメッド, エム, ユー (Ahmed, M. U.) ら著, 「バイオケミカル・ジャーナル (Biochem. J.)」, (イギリス), 1997年, 第324巻, p565-570

【非特許文献12】ブリンクマン, イー (Brinkmann, E.) ら著, 「ジャーナル・オブ・ケミカル・ソサエティー・パーキン・トランスザクションズ (J. Chem. Soc. Perkin. Trans.)」, (イギリス), 1995年, 第2巻, p1-2

【非特許文献13】ウェル-クネヒト, ケイ, ジェイ (Well-Knecht, K. J.) ら著, 「ジャーナル・オブ・オーガニック・ケミストリー (J. Org. Chem.)」, (アメリカ) 1995年, 第60巻, p6246-6247

【非特許文献14】ナガラ, アール, エイチ (Nagaraj, R. H.) ら著, 「ジャーナル

- ・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)」, (アメリカ), 1996年, 第271巻, p19338-19345
- 【非特許文献15】シパノバ, アイ, エヌ (Shipanova, I. N.) ら著, 「アーカイブス・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジックス (Arch. Biochem. Biophys.)」, (アメリカ), 1997年, 第334巻, p29-36
- 【非特許文献16】ネッパ, エム (Neeper, M.) ら著, 「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)」, (アメリカ), 1992年, 第267巻, p14998-15004
- 【非特許文献17】スズキ, エイチ (Suzuki, H.) ら著, 「ネイチャー (Nature)」, (イギリス) 1997年, 第386巻, p292-295
- 【非特許文献18】ブラッサラ, エイチ (Vlassara, H.) ら著, 「モレキュラー・メディシン (Molecular Medicine)」, (アメリカ), 1995年, 第1巻, p634-646
- 【非特許文献19】ランダー, エイチ, エム (Lander, H. M.) ら著, 「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)」, (アメリカ), 1997年, 第272巻, p17810-17814
- 【非特許文献20】チャッペイ, オー (Chappey, O.) ら著, 「ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・クリニカル・インベステイゲーション (Eur. J. Clin. Invest.)」, (イギリス), 1997年, 第27巻, p97-108
- 【非特許文献21】ヤマギシ, エス (Yamagishi, S.) ら著, 「バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.)」, (アメリカ), 1995年, 第213巻, p681-687
- 【非特許文献22】ヤマギシ, エス (Yamagishi, S.) ら著, 「エフイービーエス・レター (FEBS Lett.)」, (オランダ), 1996年, 第384巻, p103-106
- 【非特許文献23】ドイ, ティー (Doi, T.) ら著, 「プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)」, (アメリカ), 1992年, 第89巻, p2873-2877
- 【非特許文献24】ホリエ, ケイ (Horie, K.) ら著, 「ジャーナル・オブ・クリニカル・インベステイゲーション (J. Clin. Invest.)」, (アメリカ), 1997年, 第100巻, p2995-3004
- 【非特許文献25】スギモト, ケイ (Sugimoto, K.) ら著, 「ダイアベートルロジア (Diabetologia)」, (ドイツ), 1997年, 第40巻, p1380-1387
- 【非特許文献26】パーク, エル (Park, L.) ら著, 「ネイチャー・メディシン (Nat. Med.)」, (アメリカ), 1998年, 第4巻, p1025-1031
- 【非特許文献27】ミヤタ, ティー (Miyata, T.) ら著, 「ジャーナル・オブ・クリニカル・インベステイゲーション (J. Clin. Invest.)」, (アメリカ) 1993年, 第92巻, p1243-1252
- 【非特許文献28】スミス, エム, エー (Smith, M. A.) ら著, 「プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユース・エス・エー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)」, (アメリカ), 1994年, 第91(12)巻, p5710-5714
- 【非特許文献29】ミヤタ, ティー (Miyata, T.) ら著, 「バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.)」, (アメリカ), 1999年, 第244巻, p45-49
- 【非特許文献30】マキタ, ゼット (Makita, Z.) ら著, 「ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン (N. Engl. J. Med.)」, (アメリカ), 1991年, 第325巻, p836-842
- 【非特許文献31】ブカラ, アール (Bucala, R.) ら著, 「ジャーナル・オブ・クリニカル・インベステイゲーション (J. Clin. Invest.)」, (アメリカ), 1991年, 第87巻, p432-438

【非特許文献 3 2】ブラッサラ, エイチ (Vlassara, H.) ら著, 「プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユー・エス・エー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)」, (アメリカ), 1994年, 第91巻, p11704-1708

【非特許文献 3 3】ミヤタ, ティー (Miyata, T.) ら著, 「ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・ソサエティー・オブ・ネフロロジー (J. Am. Soc. Nephrol.)」, (アメリカ), 1996年, 第7巻, p1198-1206

【非特許文献 3 4】スギヤマ, エス (Sugiyama, S.) ら著, 「ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・ソサエティー・オブ・ネフロロジー (J. Am. Soc. Nephrol.)」, (アメリカ), 1998年, 第9巻, p1681-1688

【非特許文献 3 5】ミヤタ・ティー (Miyata, T.) ら著, 「キドニー・インターナショナル (Kidney Int.)」, (アメリカ), 1996年, 第49巻, p1304-1313

【非特許文献 3 6】カネストラリ, エフ (Canestrari, F.) ら著, 「アクタ・ヘマトロジカ (Acta Haematol.)」, (スイス), 1994年, 第91巻, p187-193

【非特許文献 3 7】ウエダ, ワイ (Ueda, Y.) ら著, 「バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.)」, (アメリカ), 1998年, 第245巻, p785-790

【非特許文献 3 8】カネストラリ, エフ (Canestrari, F.) ら著, 「アクタ・ヘマトロジカ (Acta Haematol.)」, (スイス), 1994年, 第91巻, p187-193

【非特許文献 3 9】リチャード, エム, ジェイ (Richard, M. J.) ら著, 「ネフロン (Nephron)」, (スイス), 1991年, 第57巻, p10-15

【非特許文献 4 0】ヤドウル, エム (Jadoul, M.) ら著, 「キドニー・インターナショナル (Kidney Int.)」, (アメリカ), 1999年, 第55巻, p2487-2492

【非特許文献 4 1】ミヤタ, ティー (Miyata, T.) ら著, 「キドニー・インターナショナル (Kidney Int.)」, (アメリカ) 1997年, 第51巻, p1170-1181

【非特許文献 4 2】ミヤタ, ティー (Miyata, T.) ら著, 「キドニー・インターナショナル (Kidney Int.)」, (アメリカ), 1999年, 第55巻, p389-399

【非特許文献 4 3】リチャード, ジェイ, ユー (Richard, J. U.) ら著, 「ファンダメンタル・アンド・アプライド・トキシコロジー (Fund. Appl. Toxic.)」, (アメリカ), 1984年, 第4巻, p843-853

【非特許文献 4 4】ミヤタ, ティー (Miyata, T.) ら著, 「キドニー・インターナショナル (Kidney Int.)」, (アメリカ), 2000年, 第58巻, p425-435

【非特許文献 4 5】ヤマダ, ケイ (Yamada, K.) ら著, 「クリニカル・ネフロロジー (Clin. Nephrol.)」, (ドイツ), 1994年, 第42巻, p354-361

【非特許文献 4 6】ミヤタ, ティー (Miyata, T.) ら著, 「ネフロロジー・ダイアリシス・トランスプランテーション (Nephrol. Dial. Transplant.)」, (イギリス), 1997年, 第12巻, p255-258

【非特許文献 4 7】エデルステイン, デイー (Edelstein, D.) ら著, 「ダイアベトロジー (Diabetologia)」, (ドイツ), 1992年, 第35巻, p96-101

【非特許文献 4 8】ハメス, エイチ, ピー (Hammes, H. P.) ら著, 「プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユー・エス・エー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)」, (アメリカ), 1991年, 第88巻, p1155-11561

【非特許文献 4 9】マツモト, ケイ (Matsumoto, K.) ら著, 「バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.)」, (アメリカ), 1997年 第241巻, p352-354

【非特許文献 5 0】ナカムラ, エス (Nakamura, S.) ら著, 「ダイアベーツ (Diabetes)」, (アメリカ), 1997年, 第46巻, p895-899

【非特許文献 5 1】ベイスウェンゲル, ピー, ジェイ (Beisswenger, P. J.) ら著, 「ダイアベーツ (Diabetes)」, (アメリカ), 1999年, 第48巻, p198-202

【非特許文献 52】ソマリー, ピー, ジェイ (Thornalley, P. J.) ら著, 「エンドクリノロジー・アンド・メタボリズム (Endocrinol. Metab.)」, (アメリカ), 1996年, 第3巻, p149-166

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0036】

本発明者らは、上記従来技術に基づく知見を前提として、非酵素的条件下、カルボニル化合物と反応することによって生じる蛋白修飾物 (AGEs および/または ALEs) が関与する病態を予防および/または治療するための薬剤を開発すべく鋭意研究を行った結果、先に、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンまたは薬理学的に許容されるその塩が効果的に AGEs、ALEs 等の蛋白修飾物の生成を抑制する事実を発見し、この発見事実に基づいて、当該物質を有効成分とする蛋白修飾物生成抑制剤の発明を完成した (特願 2003-076955 号明細書)。

【0037】

本発明者らは、その後さらに研究を続け、上記 3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンの 1 位フェニル基および 3 位メチル基を他の置換基に変化させた類縁体についても同様の活性を有することを見出したが、同時に、それら 3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンやその類縁体は、これを生体に投与した場合、ビタミン B6 欠乏症を起こすことが判明した。そこで、この欠陥を克服すべくさらに研究を進めたところ、そのようなビタミン B6 欠乏症は、血中に存在するビタミン B6 分子が 3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンやその類縁体の基本骨格である 2-ピラゾリン-5-オン環によって捕捉されることに起因するものであることが明らかとなった。そして、そのような捕捉が、当該 2-ピラゾリン-5-オン環の 4 位メチレン基に対してビタミン B6 分子が結合することによるものであることも明らかとなった。

【課題を解決するための手段】

【0038】

本発明は、このような解明事実に基づいて完成されたものであって、その目的とするところは、蛋白修飾物生成抑制剤として有用な 3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンやその類縁体について、不可避の副作用であるビタミン B6 欠乏症を抑制することにある、この目的は、本発明により、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンやその類縁体に対し、その 4 位メチレン基にビタミン B6 分子が結合することを妨害する置換基を導入することにより達成された。

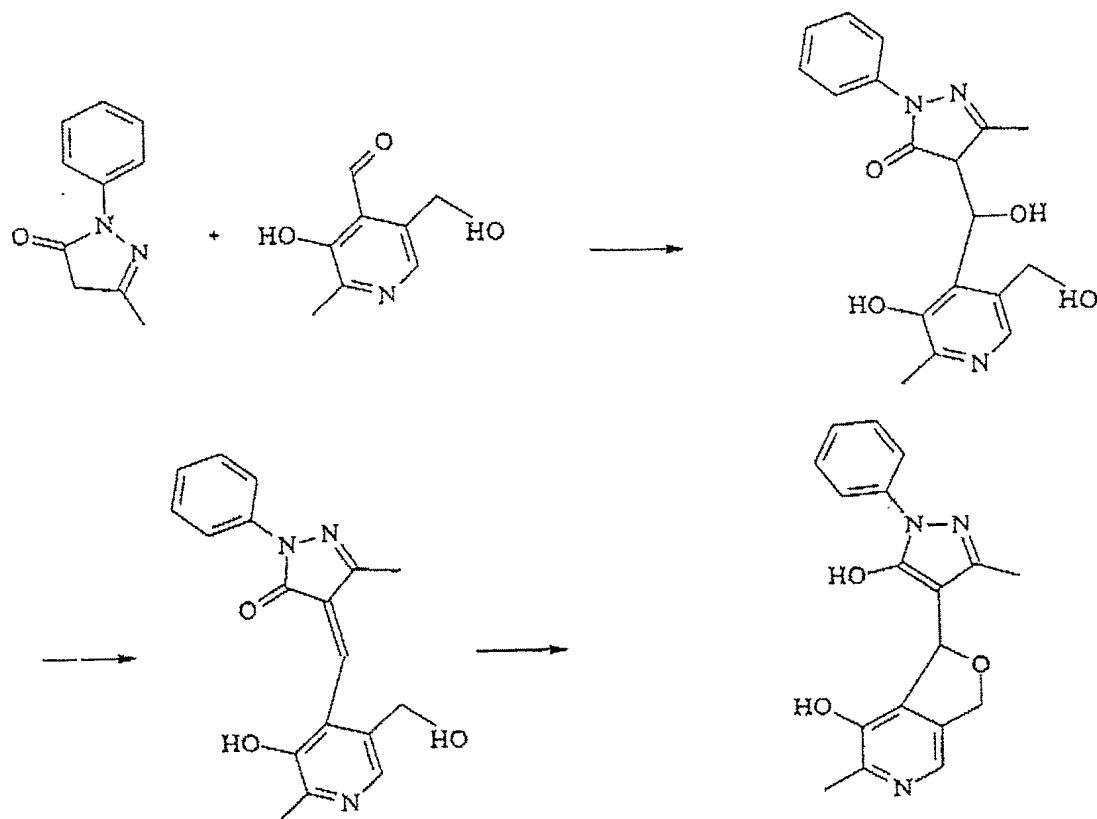
【0039】

ただし、4 位メチレン基に導入された置換基は、その種類により必ずしも安定に存在するとは限らない。たとえば、4 位メチレン基にピリドキサル残基を導入する目的で、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンにピリドキサルを反応させたところ、現実に得られるものは、4-(3-ヒドロキシ-5-ヒドロキシメチル-2-メチルピリジン-4-イルメチレン)-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンではなく、1-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-4-イル)-6-メチル-1, 3-ジヒドロフロ [3, 4-c] ピリジン-7-オールである。

【0040】

これは次式に示すように、いったん前者が形成された後、分子内転位して後者を生成するものと考えられる：

【化1】



【0041】

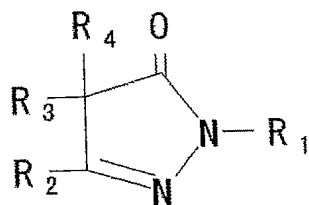
現時点までの研究によれば、ビタミンB6分子の結合を妨害するために4位メチレン基に置換基が導入された化合物は、それが上記のように分子内転位すると否とを問わず、一般に蛋白修飾物生成抑制作用を発揮する。

【0042】

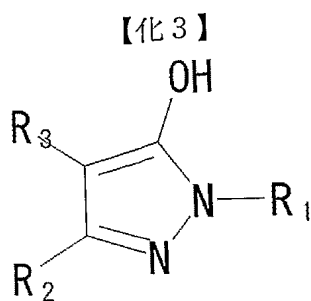
(発明を実施するための最良の形態)

すなわち、本発明は、蛋白修飾物生成抑制作用を有し、かつ、副作用としてのビタミンB6欠乏症が抑制された化合物を有効成分とする、蛋白修飾物生成抑制剤を提供するものである。有効成分は、遊離形または塩形の1-置換または非置換-3-置換または非置換-2-ピラゾリン-5-オンの4位に、ビタミンB6分子の結合を妨げる置換基(ビタミンB6分子自体に由来するものを含む)を導入した化合物またはその分子内転位体であって、特に遊離形または塩形の式(I)：

【化2】



または式(II)：



【式中、R₁は置換または非置換の芳香環基であり、R₂、R₃およびR₄はそれぞれ水素原子または1価の有機基であるか、またはR₂とR₃は両者合して縮合環を形成するか、もしくはR₃とR₄は両者合して2価の有機基を表す。ただし、R₃とR₄が共に水素原子であることはない。】

で示される化合物である。当該有効成分は、蛋白修飾物生成抑制作用を有する一方、副作用としてのビタミンB₆欠乏症を抑制されているので、薬剤としての使用に適している。

【0043】

ここに「蛋白修飾物」とは、非酵素的条件下にカルボニル化合物と反応することによって生じる蛋白修飾物（たとえばAGEs、ALEsなど）をいい、特記しない限りAGEsとALEsの両者を含むものとする。蛋白修飾物は、AGEs、ALEsまたはこれらの組合せであってもよく、AGEsには、たとえばペントシジン、クロスリン、X1（フルオロリンク）、ピロピリジン、ピラリン、カルボキシメチルリジン、イミダゾロン化合物、カルボキシエチルリジン、MG0ダイマー、GOダイマー、イミダゾリジン、アルゲピリミジンなどが含まれ、ALEsには、たとえばマロンジアルデヒドリジン、ヒドロキシノネナール修飾物などが含まれる。

【0044】

「カルボニル化合物」とは、生体由来または非生体由来に関係なく、蛋白修飾の原因となるカルボニル基を有する化合物であればよく、ジカルボニル化合物も含まれる。従って、カルボニル化合物の具体例としては、アラビノース、GO、MGO、3-DG、グリコールアルデヒド、デヒドロアスコルビン酸、ヒドロキシノネナール、マロンジアルデヒド、アクロレイン、5-ヒドロキシメチルフルフラール、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、レブリン酸、フルフラールなどを挙げることができる。

【0045】

「ビタミンB₆欠乏症」とは、ビタミンB₆の欠乏に基因する諸疾患をいい、口角炎、口内炎、舌炎、口唇炎、急性および慢性湿疹、接触性皮膚炎、末梢神経炎、貧血、リンパ球減少症、神経障害などが例示される。「ビタミンB₆（分子）」には、ピリドキシン、ピロドキサール、ピリドキサミンや、それらのリン酸エステルが包含される。

【0046】

「蛋白修飾物生成抑制剤」の有効成分である、遊離形または塩形の1-置換または非置換-3-置換または非置換-2-ピラゾリン-5-オン化合物の4位に、ビタミンB₆分子の結合を妨げる置換基（ビタミンB₆分子自体に由来するものを含む）を導入した構造を有する化合物または当該化合物の転位体は、in vivo、ex vivoまたは／およびin vitroに拘わらず、蛋白修飾物の生成を結果的に抑制することができる。「結果的に抑制する」とは、カルボニル化合物をトラップする作用を有することによるものであってもよく、蛋白修飾物を生成する反応を抑制することによるものであってもよく、最終的に蛋白修飾物の生成を抑制すればよく、その作用機序には限定されない。なお、「抑制剤」または「保護剤」の語には、予防または／および治療のために使用する薬剤が包含される。

【0047】

本発明にかかる蛋白修飾物生成抑制剤の有効成分として使用される化合物は、前記式（I）または（II）で表わすことができるものである。

【0048】

式（I）または（II）において、R₁は、水素原子または置換または非置換の芳香環（異項環を含む。）基を表わす。「芳香環基」には、20個を越えることのない環構成原

子数（そのなかに酸素、硫黄、窒素などのヘテロ原子が存在してもよいが、それらの数が4個を越えることはない）を有するものが包含され、特に環構成炭素原子数6～10個を有するアリール（たとえばフェニル、ナフチル）が好ましい。

【0049】

置換基としては、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルコキシ、低級アルケニルオキシ、低級アルカノイル、ハロ（低級）アルキル、カルボキシル、低級アルコキシカルボニル、カルボキシ（低級）アルキル、ハロ（たとえば塩素、臭素、ヨウ素、フッ素）、ニトロ、アミノ、低級アルキルアミノ、ジ（低級）アルキルアミノ、低級アルカノイルアミノ、ヒドロキシ、チオール、ヒドロキシスルホニル、アミノスルホニル、アリール（低級）アルカノイル、アリールオキシアミノ、アリール、アリール（低級）アルキル、シクロ（低級）アルキル、シクロ（低級）アルケニル、シクロ（低級）アルキル（低級）アルキル、3～7員ヘテロ環（たとえばオキサジアゾリル、チアジアゾリル）などの中から1種またはそれ以上が選択されてよい。置換基の数に制限はないが、通常、3個を越えることはない。

【0050】

R1で表される置換または非置換の芳香環基の具体例を挙げると、次のとおりである：フェニル、ナフチル、o-, m-またはp-低級アルキルフェニル（たとえばo-メチルフェニル、p-メチルフェニル、p-エチルフェニル）、o-, m-またはp-低級アルコキシフェニル（たとえばo-, m-またはp-メトキシフェニル、o-, m-またはp-エトキシフェニル）、o-, m-またはp-アミノフェニル、o-, m-またはp-ニトロフェニル、o-, m-またはp-ハロフェニル（たとえばo-, m-またはp-クロロフェニル、o-, m-またはp-フルオロフェニル）、o-, m-またはp-ハロ（低級）アルキルフェニル（たとえばo-, m-またはp-トリフルオロメチルフェニル）、o-, m-またはp-スルファモイルフェニル、o-, m-またはp-カルボキシフェニル、o-, m-またはp-低級アルコキシカルボニルフェニル（たとえばo-, m-またはp-メトキシカルボニルフェニル、o-, m-またはp-エトキシカルボニルフェニル）、o-, m-またはp-イソプロポキシカルボニルフェニル）、o-, m-またはp-低級アルカノイルフェニル（たとえばo-, m-またはp-アセチルフェニル）、ジ（低級）アルキルフェニル（たとえば3, 4-ジメチルフェニル）、ジヒドロキシフェニル（たとえば2, 4-ジヒドロキシフェニル）、2-アミノ-4-カルボキシフェニル、3-アミノ-5-カルボキシフェニル、3-低級アルコキシ-4-ヒドロキシフェニル（たとえば3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル）、3-カルボキシ-4-ハロフェニル（たとえば3-カルボキシ-4-クロロフェニル）など。

【0051】

R2、R3およびR4は、それぞれ独立して、水素原子または1価の有機基を表わす。「1価の有機基」には、置換または非置換の炭化水素基、ハロ基、ニトロ基、アミノ基、ヒドロキシ基、チオール基、カルボキシ基、カルボキシ（低級）アルキル基、低級アルコキシカルボニル基、ホルミル基、低級アルカノイル基、低級アルキルアミノ基、ジ（低級）アルキルアミノ基、低級アルカノイルアミノ基、アリール（低級）アルカノイル基、アリールオキシアミノ基、スルホン酸基、3～7員ヘテロ環基などが包含される。「炭化水素基」には、炭素数30個を越えない（好ましくは8個を越えない）鎖状または環状の、脂肪族、脂環式または芳香族炭化水素基が包含され、具体的にはアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、アリール基などが例示される。「3～7員ヘテロ環基」は、環構成原子として3個を越えないヘテロ原子を含むものであり、たとえばピロリジノ、ピペリジノ、モルホリノ、チアモルホリノなどが挙げられる。置換基の種類と数は、R1について説明したのと同様である。ただし、R3とR4が共に水素原子であることはない。

【0052】

また、R2とR3は、両者合して縮合環を形成することができる。当該縮合環は、5または6員飽和炭素環（すなわち、R2+R3＝トリメチレンまたはテトラメチレン）が好

ましく、置換基が存在していてもよい。なおまた、R3とR4は、両者合して2価の有機基を表わすことができる。当該2価の有機基としては、たとえばメチレンタイプのものとスピロタイプのものを挙げることができる。メチレンタイプのものとしては、フェニルメチレン、フェニルアルケニルメチレン、キノリニルメチレン、フラニルメチレン、ジアゾリルメチレン、アミノメチレン、ジ(低級)アルキルアミノメチレン、ピリジルメチレン、チオフエニルメチレンなどが例示され、それらは、適宜、置換基を有していてもよい。これら縮合環や2価の有機基に存在しうる置換基の種類と数は、R1の場合と同様であってよい。

【0053】

なお、上記において、アルキル、アルコキシ、アルカノイルなどの語に関連して使用された「低級」なる言葉は、通常、炭素数8個まで、好ましくは炭素数5個までの基を指称するものとして使用される。

【0054】

本発明の化合物(I)または(II)の具体例を挙げれば、次のとおりである:

1. 2-(3-アミノ-5-オキシ-1-フェニル-4,5-ヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)-2-オキシ-N-フェニル-アセトアミド;
2. 2-(3-アミノ-5-オキシ-1-フェニル-4,5-ヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)-2-オキシ-N-チアゾール-2-イル-アセトアミド;
3. 2-(3-アミノ-5-オキシ-1-フェニル-4,5-ヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)-2-オキシ-アセトアミド;
4. 2-(3-アミノ-5-オキシ-1-フェニル-4,5-ヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)-N-(3,4-ジメチル-フェニル)-4-オキシ-ブチルアミド;
5. 2-(4-アミノ-フェニル)-4-(2-ヒドロキシ-エチル)-5-メチル-2,4-ヒドロ-ピラゾール-3-オン;

【0055】

6. 5-アミノ-2-フェニル-4-(1-フェニル-1H-テトラゾール-5-イルスルファニル)-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
7. 3-(3-メチル-5-オキシ-1-フェニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)-プロピオン酸;
8. N-(3-メチル-5-オキシ-1-フェニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)-アセトアミド;
9. 4-[(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)-フェニル-メチル]-5-メチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
10. 2-フェニル-3a,4,5,6-テトラヒドロ-2H-シクロペンタピラゾール-3-オン;

【0056】

11. 4-メチル-N-(3-メチル-5-オキシ-1-フェニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)-ベンゼンスルホンアミド;
12. N-(3-メチル-5-オキシ-1-フェニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)-アセトアミド;
13. 5-メチル-2-(3-ニトロ-フェニル)-4-(1-フェニル-1H-テトラゾール-5-イルスルファニル)-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
14. N-[5-オキシ-1-フェニル-4-(1-フェニル-1H-テトラゾール-5-イルスルファニル)-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-3-イル]-ベンズアミド;
15. 4-(ヒドロキシ-フェニル-メチル)-2-フェニル-5-トリフルオロメチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

【0057】

16. 4-(1-ヒドロキシイミノ-エチル)-2,5-ジフェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
17. 5,5'-ジメチル-2,2'-ジフェニル-2,4,2',4'-テトラヒドロ-[4,4']ビピラゾール-3,3'-ジオン;

18. 2-(4-クロロ-フェニル)-4-エチル-5-メチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
19. 4-[4-(4-メトキシ-フェニル)-チアゾール-2-イルスルファニール]-5-メチル-5-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
20. 4-(2-オキソ-2-フェニル-エチル)-2-フェニル-5-プロピル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

【0058】

21. 5-メチル-2-フェニル-4-(4-p-トルイル-チアゾール-2-イルスルファニール)-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
22. 2-(4-フルオロ-フェニル)-4-[[1-(4-フルオロ-フェニル)-5-ヒドロキシ-3-メチル-1H-ピラゾール-4-イル]-(2-ヒドロキシ-フェニル)-メチル]-5-メチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
23. N-(3,4-ジメチル-フェニル)-2-(3-メチル-5-オキソ-1-フェニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)-2-オキソ-アセトアミド;
24. 5-(4-クロロ-ベンゾイル)-4,4-ジヒドロキシ-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
25. ソジウム; 4-ヒドロキシ-3-メチル-5-オキソ-1-フェニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-スルホン酸ナトリウム;

【0059】

26. 5-メチル-4,4-ジ-モルホリン-4-イル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
27. 3-ベンゾイルアミノ-4-ヒドロキシ-5-オキソ-1-フェニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-スルホン酸ナトリウム;
28. 3-メチル-1-フェニル-5-オキソ-4-スピロ(3オキソ-2,3-ジヒドロ-ベンゾ[b]チオフェン-2-イル)-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール;
29. 4,4,5-トリメチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
30. 4,10-ジメチル-2,8,11-トリフェニル-2,3,8,9-テトラザ-ジスピロ[4.0.4.1]ウンデカ-3,9-ジエン-1,7-ジオン;

【0060】

31. 2-(2-クロロ-フェニル)-4-(3-エトキシ-4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
32. 2-(2-クロロ-フェニル)-4-(4-ジメチルアミノ-ベンジリデン)-5-メチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
33. 5-メチル-4-(3-フェニル-アリリデン)-2-(3-トリフルオロメチル-フェニル)-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
34. 3-{5-[3-メチル-5-オキソ-1-(4-スルファモイル-フェニル)-1,5-ジヒドロ-ピラゾール-4-イリデンメチル]-フラン-2-イル}-安息香酸;
35. 4-(4-デメチルアミノ-ベンジリデン)-2-(3-フルオロ-フェニル)-5-メチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

【0061】

36. 3-{4-[4-(3-クロロ-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル)-ベンジリデン]-3-メチル-5-オキソ-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル}-安息香酸;
37. 3-[4-(2-ヒドロキシ-ベンジリデン)-5-オキソ-3-フェニル-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-安息香酸;
38. 3-[1-(3-クロロ-フェニル)-3-メチル-5-オキソ-1,5-ジヒドロ-ピラゾール-4-イリデンメチル]-1H-キノリン-2-オン;
39. 3-{5-[3-メチル-5-オキソ-1-(4-スルファモイル-フェニル)-1,5-ジヒドロ-ピラゾール-4-イリデンメチル]-フラン-2-イル}-安息香酸メチル;
40. 4-(4-ベンゾ[1,3]ジオキソール-5-イルメチレン-3-メチル-5-オキソ-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル)-安息香酸メチル;

【0062】

41. 4-[3-メチル-5-オキソ-4-[5-(4-スルファモイル-フェニル)-フラン-2-イルメチレン]-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-安息香酸メチル;
42. 2-(4-クロロ-フェニル)-4-(2,4-ジヒドロキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
43. 2-(4-クロロ-フェニル)-4-(3-ヒドロキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
44. 4-(3,4-ジヒドロキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2-p-トルイル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
45. 3-[1-(4-アセチル-フェニル)-3-メチル-5-オキソ-1,5-ジヒドロ-ピラゾール-4-イリデン]-1,3-ジヒドロ-インドール-2-オン;

【0063】

46. 2-(4-フルオロ-フェニル)-4-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-o-トルイル-1H-ピラゾール-4-イルメチレン)-5-メチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
47. 2-(4-クロロ-フェニル)-4-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ-ベンジリデン)-5-トリフルオロメチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
48. 2-(4-エチル-フェニル)-4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
49. 4-[4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-ベンゼンスルホンアミド;
50. 4-(5-オキソ-4-チオフェン-2-イルメチレン-3-トリフルオロメチル-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル)-安息香酸エチル;

【0064】

51. 4-[4-(4-ジメチルアミノ-ベンジリデン)-5-オキソ-3-トリフルオロメチル-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-ベンゼンスルホンアミド;
52. 4-イソプロピリデン-5-メチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
53. 4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-2-フェニル-5-トリフルオロメチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
54. 4-(2,4-ジヒドロキシ-ベンジリデン)-2-(3,4-ジメチル-フェニル)-5-メチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
55. 3-[4-(3-エトキシ-4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-安息香酸;

【0065】

56. 4-[4-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-安息香酸;
57. 3-[3-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-安息香酸;
58. 3-[3-ヒドロキシ-4-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ-ベンジリデン)-5-オキソ-ピラゾリジン-1-イル]-安息香酸;
59. 4-(3-ヒドロキシ-2,4-ジメトキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
60. 4-[4-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-ピラゾリジン-1-イル]-安息香酸イソプロピル;

【0066】

61. 2-クロロ-5-[4-(2-クロロ-4-ヒドロキシ-5-メトキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-安息香酸;
62. 4-[4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-安息香酸エチル;
63. 4-[4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-5-オキソ-3-トリフルオロメチル-4,5-ジ

ヒドロ-ピラゾール-1-イル]-安息香酸エチル;

64. 4-[4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-安息香酸;

65. 4-ジメチルアミノメチレン-5-メチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

【0067】

66. 4-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イルメチレン)-5-メチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

67. 4-(4-クロロ-ベンジリデン)-5-メチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

68. 1-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)-6-メチル-1,3-ジヒドロ-フロ[3,4-c]ピリジン-7-オール;

69. 1-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)-6-メチル-1,3-ジヒドロ-フロ[3,4-c]ピリジン-7-オール(塩酸塩);

70. 4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

【0068】

71. 2-(3-クロロ-フェニル)-4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

72. 4-(4-ベンジルオキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

73. 2-(3-クロロ-フェニル)-5-メチル-2H-ピラゾール-3,4-ジオン 4-オキシム;

74. 5-(5-オキソ-1,3-ジフェニル-1,5-ジヒドロ-ピラゾール-4-イリデン)-4-フェニル-4,5-ジヒドロ-[1,3,4]チアゾール-2-カルボン酸エチル;

75. 4-[1,3]ジチオラン-2-イリデン-5-メチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

【0069】

76. 5-(4-クロロ-フェニルスルファニルメチル)-2-フェニル-4-[N'-(3-トリフルオロメチル-フェニル)-ヒドラジノ]-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

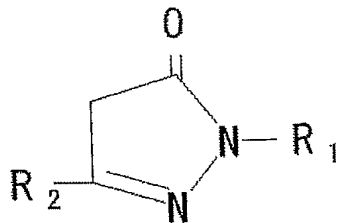
77. 4-(5-ベンゾイル-3-フェニル-3H-[1,3,4]チアジアゾール-2-イリデン)-2,5-ジフェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

78. フォスフォリックアシッド モノ-[5-ヒドロキシ-6-メチル-4-(3-メチル-5-オキソ-1-フェニル-1,5-ジヒドロ-ピラゾール-4-イリデンメチル)-ピリジン-3-イルメチル]エステルなど。

【0070】

上記本発明目的化合物(I)を製造するには、一般に、次式で表わされる1-置換または非置換-3-置換または非置換-2-ピラゾリン-5-オン(III)を、4位に導入すべき置換基の種類に応じて、適宜、自体公知の化学反応に付すればよい:

【化4】



[式中、R1は水素原子または置換または非置換の芳香環基であり、R2は水素原子または1価の有機基である。]

【0071】

たとえば、化合物(III)と式: R3-CHO(IV)で示されるアルデヒドとを反

応させることによって、化合物 (I) を製造することができる。また、化合物 (I) は、分子内転位を生じさせ、化合物 (II) として取得することも可能である。通常、化合物 (III) とアルデヒド (IV) を、水性媒体中、アルカリ条件下、または有機溶媒（たとえばテトラヒドロフラン、ジオキサン）中、有機または無機塩基の存在下、 $-20 \sim 100^{\circ}\text{C}$ で処理することによって実施することができる。

【0072】

出発物質である化合物 (III) は、それ自体、公知であるか、または、自体常套の化学反応を利用して製造することができる。たとえば、化合物 (III) における R1 がフェニル、R2 がメチルである 3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンは、一般名をエダラボン (edaravone) と称し、フリーラジカル消去作用を有しており、脳機能正常化剤（特公平 5-31523 号公報）、過酸化脂質生成抑制剤（特公平 5-35128 号公報）、抗潰瘍剤（特許第 2906512 号公報）、血糖上昇抑制剤（特許第 2906513 号公報）などの薬剤として有用であることが知られている。ただし、エダラボンが、カルボニル化合物をトラップし、カルボニルストレス状態を改善して、カルボニルストレス下で発生する種々の病態の予防または治療に有効であること、すなわち蛋白修飾物生成抑制剤としての有用であることは、特願 2003-076955 号明細書で開示される以前には、知られていなかった。

【0073】

上記したとおり、化合物 (I) または (II) は、生体内において、副作用としてのビタミン B6 欠乏症を示すことなく、それ自体で蛋白修飾物生成抑制作用を示すものである。この事実は、次の試験によって確認することができる：

【0074】

(A) 化合物 (I) がそれ自体で蛋白修飾物生成抑制作用を示す事実を証明する試験：

(1) 代表的な AGEs であるペントシジンを指標として、非糖尿病の腎不全透析患者から血漿を採取し、本発明の化合物を加え、一定時間後のペントシジン生成量を測定した。

(2) フェニルアラニン、ヒドロキシラジカル存在下で OH ラジカルと結合し、o- または m- チロシンを生成する。さらに、チロシンは、パーオキシナイトライト存在下で NO ラジカルと反応してニトロチロシンを生成する。一方、ラジカルは生体内で腎に障害を与えることが知られている。そこで、フェニルアラニン-ラジカル反応系における本発明の化合物のラジカル捕捉能を検証した。

【0075】

(B) 化合物 (I) がビタミン B6 欠乏症を惹起しないことを証明する試験：

(1) ビタミン B6 溶液に本発明の化合物を加え、一定時間後のビタミン B6 残存量を測定した。

(2) 正常ラットに本発明の化合物を投与し、一定期間後のビタミン B6 欠乏症発症の有無を確認した。

【0076】

化合物 (I) または (II) を有効成分として含有する本発明の蛋白修飾物生成抑制剤は、以下に例示する病態の予防および／または治療に有用である：腎障害、糖尿病合併症（腎症、神経障害、網膜症、白内障など）、動脈硬化、透析合併症である透析アミロイドーシス、腹膜透析患者における腹膜硬化症、中枢神経疾患であるアルツハイマー病、ピック病およびパーキンソン病、リウマチ性関節炎、日光弾性線維症、老化など。当該抑制剤は、特に腎障害、予防および／または治療するのに有用である。

【0077】

予防剤または治療剤として用いる場合、化合物 (I) または (II) を、そのままあるいは水に希釈する等の各種処理を施して使用することができ、医薬品、医薬部外品等に配合して使用することができる。この場合の配合量は、病態や製品に応じて適宜選択されるが、通常全身投与製剤の場合には、0.001~50重量%、特に0.01~10重量%とすることができ、0.001重量%より少ないと満足する予防または治療作用が認められない可能性があ

り、また、5重量%を越えると製品そのものの安定性や香味等の特性が損なわれる可能性があるので好ましくない。

【0078】

化合物(I)または(II)は、遊離形または塩形で製剤中に含有されてよい。塩形としては、通常、薬剤学的に許容されているもの、たとえば無機塩基や有機塩基との塩、無機酸、有機酸、塩基性または酸性アミノ酸などの酸付加塩などが挙げられる。無機塩基との塩としては、たとえばアルカリ金属(ナトリウム、カリウムなど)塩、アルカリ土類金属(カルシウム、マグネシウムなど)塩、アルミニウム塩、アンモニウム塩などが挙げられる。有機塩基との塩としては、たとえば第1級アミン(エタノールアミンなど)、第2級アミン(ジエチルアミン、ジエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミンなど)、第3級アミン(トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、トリエタノールアミンなど)との塩が挙げられる。

【0079】

無機酸との塩としては、塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸などとの塩が例示され、有機酸との塩としては、ギ酸、酢酸、乳酸、トリフルオロ酢酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、安息香酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸などとの塩が例示される。さらに、塩基性アミノ酸との塩としては、アルギニン、リジン、オルニチンなどとの塩が例示され、酸性アミノ酸との塩としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩が例示される。

【0080】

化合物(I)または(II)は、必要に応じて、アミノグアニジン、ピリドキサミン誘導体、OPB-9195、ビグアナイド化合物、架橋形成阻害薬、アマドリ化合物を分解する酵素、GSH、システイン、アセチルシステイン、ビタミンE、ユビキノール、アルドース還元酵素阻害薬、カルボニル化合物トラップ剤など、公知のの薬物と共に使用されてもよく、これにより蛋白修飾物生成抑制作用の持続性を高めることができる。また、化合物(I)または(II)を失活化または分解する物質を同定し、これを阻害する物質を選択し、これを併用あるいは配合し、組成物中の有効成分の安定化を図ることができる。

【0081】

本発明の薬剤の投与方法として、経口投与や静脈内投与以外に、経粘膜投与、経皮投与、筋肉内投与、皮下投与、直腸内投与などが適宜選択でき、その投与方法に応じて、種々の製剤として用いることができる。以下に、各製剤について記載するが、本発明において用いられる剤型はこれらに限定されるものではなく、医薬製剤分野において通常用いられる各種製剤として用いることができる。

【0082】

蛋白修飾物が関与する病態に対する予防薬または治療薬として用いる場合には、化合物(I)または(II)の経口投与量は、一般的に0.03mg/kg~100mg/kgの範囲が好ましく、より好ましくは0.1mg/kg~50mg/kgである。全身投与を行う場合、特に静脈内投与の場合には老若男女または体型等により変動があるが、通常、有効血中濃度が0.2 μ g/mL~20 μ g/mL、より好ましくは0.5 μ g/mL~10 μ g/mLの範囲となるように投与する。

【0083】

経口投与を行う場合の剤型として、散剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤、錠剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤などがあり、適宜選択することができる。また、口腔内局所投与を行う場合の剤型として、咀嚼剤、舌下剤、バツカル剤、トローチ剤、軟膏剤、貼布剤、液剤などがあり、適宜選択することができる。なお、上記製剤について徐放化、安定化、易崩壊化、難崩壊化、腸溶性化、易吸収化等の修飾を施してもよい。

【0084】

上記の各剤型について、公知のドラッグデリバリーシステム(DDS)の技術を採用することができる。本明細書に言うDDS製剤とは、徐放化製剤、局所適用製剤(トローチ、バツカル錠、舌下錠など)、薬物放出制御製剤、腸溶性製剤、胃溶性製剤などのような、投

与経路、バイオアベイラビリティ、副作用などを勘案して、最適の製剤形態にした製剤をいう。

【0085】

DDSの構成要素には、基本的に薬物、薬物放出モジュール、被包体および治療プログラムが含まれ、各々の構成要素について、特に放出を停止させた時に速やかに血中濃度が低下する半減期の短い薬物が好ましく、投与部位の生体組織と反応しない被包体が好ましく、さらに、設定された期間において最良の薬物濃度を維持する治療プログラムを有するのが好ましい。薬物放出モジュールは、基本的に薬物貯蔵庫、放出制御部、エネルギー源および放出孔または放出表面を有している。これら基本的構成要素は全て揃っている必要はなく、適宜追加あるいは削除等を行い、最良の形態を選択することができる。

【0086】

DDSに使用できる材料としては、高分子、シクロデキストリン誘導体、レシチンなどがある。高分子には不溶性高分子（シリコン、エチレン・酢酸ビニル共重合体、エチレン・ビニルアルコール共重合体、エチルセルロース、セルロースアセテートなど）、水溶性高分子およびヒドロキシゲル形成高分子（ポリアクリルアミド、ポリヒドロキシエチルメタクリレート架橋体、ポリアクリル架橋体、ポリビニルアルコール、ポリエチレンオキシド、水溶性セルロース誘導体、架橋ポロキサマー、キチン、キトサンなど）、徐溶解性高分子（エチルセルロース、メチルビニルエーテル・無水マレイン酸共重合体の部分エステルなど）、胃溶性高分子（ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルメロースナトリウム、マクロゴール、ポリビニルピロリドン、メタアクリル酸ジメチルアミノエチル・メタアクリル酸メチルコポリマーなど）、腸溶性高分子（ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、酢酸フタルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート、カルボキシメチルエチルセルロース、アクリル酸系ポリマーなど）、生分解性高分子（熱凝固または架橋アルブミン、架橋ゼラチン、コラーゲン、フィブリン、ポリシアノアクリレート、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリβヒドロキシ酢酸、ポリカプロラクトンなど）があり、剤型によって適宜選択することができる。

【0087】

特に、シリコン、エチレン・酢酸ビニル共重合体、エチレン・ビニルアルコール共重合体およびメチルビニルエーテル・無水マレイン酸共重合体の部分エステルは薬物の放出制御に使用でき、セルロースアセテートは浸透圧ポンプの材料として使用でき、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースおよびメチルセルロースは、徐放性製剤の膜素材として使用でき、ポリアクリル架橋体は口腔粘膜あるいは眼粘膜付着剤として使用できる。

【0088】

また、製剤中には、その剤形（経口投与剤、注射剤、座剤など）に応じて、溶剤、賦形剤、コーティング剤、基剤、結合剤、滑沢剤、崩壊剤、溶解補助剤、懸濁化剤、粘稠剤、乳化剤、安定剤、緩衝剤、等張化剤、無痛化剤、保存剤、矯味剤、芳香剤、着色剤など適宜の添加剤を配合して製造することができる。これら各添加剤について、以下にそれぞれの具体例を挙げるが、これらに特に限定されるものではない。

【0089】

溶剤としては、精製水、注射用水、生理食塩液、ラッカセイ油、エタノール、グリセリンなどを挙げることができる。賦形剤としては、デンプン類、乳糖、ブドウ糖、白糖、結晶セルロース、硫酸カルシウム、炭酸カルシウム、タルク、酸化チタン、トレハロース、キシリトールなどを挙げることができる。コーティング剤としては、白糖、ゼラチン、酢酸フタル酸セルロースおよび上記記載した高分子などを挙げることができる。基剤としては、ワセリン、植物油、マクロゴール、水中油型乳剤性基剤、油中水型乳剤性基剤などを挙げることができる。

【0090】

結合剤としては、デンプンおよびその誘導体、セルロースおよびその誘導体、ゼラチン

、アルギン酸ナトリウム、トラガント、アラビアゴムなどの天然高分子化合物、ポリビニルピロリドンなどの合成高分子化合物、デキストリン、ヒドロキシプロピルスターチなどを挙げることができる。滑沢剤としては、ステアリン酸およびその塩類、タルク、ワックス類、小麦デンプン、マクロゴール、水素添加植物油、シヨ糖脂肪酸エステル、ポリエチレングリコールなどを挙げることができる。崩壊剤としては、デンプンおよびその誘導体、寒天、ゼラチン末、炭酸水素ナトリウム、セルロースおよびその誘導体、カルメロースカルシウム、ヒドロキシプロピルスターチ、カルボキシメチルセルロースおよびその塩類ならびにその架橋体、低置換型ヒドロキシプロピルセルロースなどを挙げることができる。

【0091】

溶解補助剤としては、シクロデキストリン、エタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなどが挙げられる。懸濁化剤としては、アラビアゴム、トラガント、アルギン酸ナトリウム、モノステアリン酸アルミニウム、クエン酸、各種界面活性剤などが挙げられる。粘稠剤としては、カルメロースナトリウム、ポリビニルピロリドン、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアルコール、トラガント、アラビアゴム、アルギン酸ナトリウムなどが挙げられる。乳化剤としては、アラビアゴム、コレステロール、トラガント、メチルセルロース、各種界面活性剤、レシチンなどが挙げられる。

【0092】

安定剤としては、亜硫酸水素ナトリウム、アスコルビン酸、トコフェロール、キレート剤、不活性ガス、還元性物質などがある。緩衝剤としては、リン酸水素ナトリウム、酢酸ナトリウム、ホウ酸などがある。等張化剤としては、塩化ナトリウム、ブドウ糖などがある。無痛化剤としては、塩酸プロカイン、リドカイン、ベンジルアルコールなどがある。保存剤としては、安息香酸およびその塩類、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、逆性石けん、ベンジルアルコール、フェノール、チロメサルなどがある。矯味剤としては、白糖、サッカリン、カンゾウエキス、ソルビトール、キシリトール、グリセリンなどがある。芳香剤としては、トウヒチンキ、ローズ油などがある。着色剤としては、水溶性食用色素、レーキ色素などがある。

【0093】

上記したように、医薬品を徐放化製剤、腸溶性製剤または薬物放出制御製剤のようなDDS製剤化することにより、薬物の有効血中濃度の持続化、バイオアベイラビリティの向上などの効果が期待できる。しかし、化合物(I)または(II)は生体内で失活化または分解され、その結果、所望の効果が低下または消失する可能性がある。従って、化合物(I)または(II)を失活化または分解する物質を阻害する物質を本発明の蛋白修飾物に関与する病態の予防または治療組成物と併用することにより、成分の効果をさらに持続化させ得る。これらは製剤中に配合してもよく、または別々に投与してもよい。当業者は適切に、化合物(I)または(II)を失活化または分解する物質を同定し、これを阻害する物質を選択し、配合あるいは併用することができる。

【0094】

製剤中には、上記以外の添加物として通常の組成物に使用されている成分を用いることができる。これらの成分の添加量は、本発明の効果を妨げない範囲で通常量とすることができる。

【0095】

化合物(I)または(II)は、また、腹膜透析や血液透析における蛋白修飾物質による障害を抑制するために使用することができる。すなわち、蛋白修飾物生成抑制剤としての化合物(I)または(II)を、常套の腹膜透析液や血液透析液中に配合すればよい。

【0096】

本発明による液体試料中のカルボニル化合物含有量を低減させる方法は、蛋白修飾物生成抑制剤としての化合物(I)または(II)と当該液体試料とを接触させる工程を含むものである。

【0097】

また、本発明の蛋白修飾物の生成抑制方法は、蛋白修飾物生成抑制剤としての化合物（I）または（II）を、患者血液または腹膜透析液と接触させる工程を含むものである。透析における蛋白修飾物としては、腹膜透析または血液透析を受ける患者に由来するカルボニル化合物により生成される蛋白修飾物および腹膜透析液または血液透析液自体に由来するカルボニル化合物により生成される蛋白修飾物などが含まれる。

【0098】

化合物（I）または（II）を添加する腹膜透析液または血液透析液の組成は、公知のものでよい。一般的な腹膜透析液は、浸透圧調節剤（グルコースなど）、緩衝剤（乳酸、クエン酸、リンゴ酸、酢酸、ピルビン酸、コハク酸、炭酸水素ナトリウムなど）、無機塩類（ナトリウムイオン、カリウムイオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオン、塩素イオンなど）などで構成されている。化合物（I）または（II）を添加した腹膜透析液または血液透析液は、そのまま密封して加熱滅菌することができる。そうすることによって、加熱滅菌処理時または保存時に伴う、これら主成分からの蛋白修飾物の生成を抑制することができる。

【0099】

また、第一室および第二室からなる分画された容器に腹膜透析などの液を収容し、第一室に還元糖を収容し、第二室に化合物（I）または（II）を収容し、使用直前に混合しても良い。アミノ酸が含まれる場合には、当業者は適宜第三室を設ける等、最良の形態をとることができる。

【0100】

腹腔内または血管内に投与された後は、化合物（I）または（II）が蛋白修飾物の生成を抑制するため、腹膜硬化のような副作用を軽減できる。さらに、その他の病態（糖尿病合併症など）の予防・治療にも効果を発揮することが期待できる。透析液には、化合物（I）または（II）の他に、公知のアミノグアニジンなどの薬物を混合して用いることができる。また、粉末型透析剤にも応用可能である。

【0101】

適当な混注用コネクターを装備した透析回路に、化合物（I）または（II）を注入することもできる。また、化合物（I）または（II）を直接腹腔内に注入して、腹腔内で腹膜透析液と混合することもできる。また、腹膜透析液を患者へ注入する前、または腹腔内貯留中に、化合物（I）または（II）を静脈内注射することにより、蛋白修飾物の生成を効果的に抑制することもできる。

【0102】

透析液などは、適当な密閉容器に充填し、滅菌処理する。滅菌処理には高圧蒸気滅菌や熱水滅菌などの加熱滅菌が有効である。この場合、高温で有害物質を溶出せず、滅菌後も輸送に耐える強度を備えた容器を用いる。具体的には、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリエステル、エチレン酢酸ビニル共重合体などからなる可撓性プラスチックバッグが挙げられる。また、外気の影響による液の劣化を避けるために、透析液等を充填した容器をさらにガスバリアー性の高い包装材で包装しても良い。

【0103】

高圧加熱滅菌を含む加熱滅菌により滅菌処理を行う場合、用いられる化合物（I）または（II）が加熱などの処理に対して十分安定であるならば、透析液配合時に化合物（I）または（II）を予め添加してから、加熱滅菌操作を行うこともできる。用いる化合物（I）または（II）が加熱滅菌に安定でない場合は、加熱を要しない滅菌法を用いることもできる。この様な滅菌法には、たとえば濾過滅菌などがある。

【0104】

たとえば、孔径 $0.2\mu\text{m}$ 程度のメンブランフィルターを備えた精密濾過器を用いて濾過することにより滅菌することができる。濾過滅菌された透析液は、可撓性プラスチックバッグなどの容器に充填された後、密封される。また、予め加熱滅菌した腹膜透析液などに、後で化合物（I）または（II）を添加しても良い。

【0105】

添加する時期は特に限定されない。液を滅菌後あるいは滅菌前に化合物(I)または(II)を添加しても良いし、透析直前または同時に添加しても良いし、透析液を注した後に直接腹膜に注入しても良い。

【0106】

本発明の腹膜透析液は、現行の腹膜透析液や血液透析液と同様の透析処理に利用される。すなわち、腹膜透析の場合にあっては、透析患者の腹腔内に本発明による腹膜透析液を適量注入し、腹膜を通過して生体内の低分子量成分を腹膜透析液内に移行させる。腹膜透析液は間欠的に循環させ、患者の症状に応じて透析を継続する。このとき、化合物(I)または(II)は透析液内または生体内での蛋白修飾物の生成を抑制する。クレアチニンや無機塩類、あるいは塩素イオン等の透析成分とともに、カルボニル化合物も血中や腹膜内から腹膜透析液中へ移行する。ゆえに、蛋白修飾物による生体への悪影響が減少される。

【0107】

化合物(I)または(II)は、透析液のみに使用できるのではなく、栄養輸液、電解質輸液、経腸・経管栄養剤など、あらゆる液剤に利用できる。

【発明の効果】

【0108】

本発明により、効果的にAGEs、ALEs等の蛋白修飾物の生成を抑制する蛋白修飾物生成抑制剤が提供される。特に、腎障害、腎症、神経障害、網膜症、白内障等の糖尿病合併症、動脈硬化、透析合併症である透析アミロイドーシス、腹膜透析患者における腹膜硬化症、中枢神経疾患であるアルツハイマー病、ピック病、パーキンソン病、リウマチ性関節炎、日光弾性線維症、老化等に対して、予防および/または治療用の薬剤が、本発明により提供され得る。特に、腎障害、糖尿病合併症である糖尿病性腎症において血圧降下剤の腎保護薬としての適応があるが、本発明により血圧降下作用を薬理作用として持たない、多くの患者に幅広く使用出来る腎保護薬が提供され得る。

【実施例】

【0109】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

〔製造例1〕 1-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)-6-メチル-1,3-ジヒドロ-フロ[3,4-c]ピリジン-7-オールの製造

0.1M NaOH (100mL) にエダラボン (1.74g) を室温で攪拌しながら溶解した液に、水 (100mL) にピリドキサル塩酸塩 (2.44g) を溶解した液を攪拌しながら滴下して加え、反応させた。滴下終了後、約30分間攪拌し、白色沈殿の析出が終了したと思われる時点を反応終了点とし、4℃の低温室にて放冷して、沈殿物を十分に析出させた。該反応液を一夜放冷後、析出した白色沈殿物を濾取し、1-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)-6-メチル-1,3-ジヒドロ-フロ[3,4-c]ピリジン-7-オール_{粗生成物(wet)}を (23.7g) 得た。

【0110】

該粗生成物をメタノール (50mL) に懸濁させ、50℃で超音波攪拌器中60分間攪拌した後、溶け残った不溶物を濾過して取り除き、濾液を約10mLに濃縮後、4℃の低温室に一夜放冷して結晶を析出させた。析出した結晶を濾取し、真空デシケータ中、遮光下に乾燥して1-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)-6-メチル-1,3-ジヒドロ-フロ[3,4-c]ピリジン-7-オール_{の純粋な結晶} (0.22g) を得た。収率: 6.8%。外観性状: 結晶性粉末、淡黄白色。融点: 207-209℃ (褐変溶融)。

【0111】

〔製造例2〕 1-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)-6-メチル-1,3-ジヒドロ-フロ[3,4-c]ピリジン-7-オール塩酸塩の製造

0.5006gの1-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)-6-メチル-1

、3-ジヒドロ-フロ[3,4-c]ピリジン-7-オールを150mLのメタノールに溶解し、2N塩酸メタノール1.65mLを加えてよく攪拌した。該溶解液を約20mL程度に濃縮し、結晶が析出し始めた時点で、結晶溶媒を置換するため、50mLのエタノールを加えて濃縮し、この操作を2回繰り返してから、約5mLまで濃縮した。この濃縮液を一夜低温室(4℃)に放置し、析出した結晶を濾取し、真空デシケーター中で乾燥して、1-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)-6-メチル-1,3-ジヒドロ-フロ[3,4-c]ピリジン-7-オールの一塩酸塩(0.5011g)を得た。収率90.0%。外観性状:結晶性粉末、淡黄白色。融点:247-249℃(褐変溶融)。

【0112】

[試験例1] ペントシジン生成抑制効果

1-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)-6-メチル-1,3-ジヒドロ-フロ[3,4-c]ピリジン-7-オール(以下、「TM2002」という。)について、代表的なAGEsであるペントシジンの生成抑制効果を調べた。

【0113】

血液透析患者の透析前の血漿を同意の下に透析前に採取し、濾過滅菌した。血漿(450μL)にTM2002のジメチルスルホキシド溶液(50μL)を加え(最終濃度:0.8、2.0、5.0mM)、37℃で1週間インキュベートし、ペントシジンの生成量を測定した。

【0114】

ペントシジンの測定は、以下のようにして行った。インキュベーション後の各試料(50μL)に、等容積の10%トリクロロ酢酸を加えた後、5000gで5分間遠心分離した。上清を除く後、ペレットを5%トリクロロ酢酸(300μL)で洗浄した。ペレットを減圧下乾燥後、窒素雰囲気下で6N HCl溶液(100μL)中にて、110℃で16時間加水分解を行った。次いで酸加水分解物に5N NaOH(100μL)および0.5Mリン酸緩衝液(pH7.4)(200μL)を添加した後、0.5μm孔のポアフィルタを通して濾過し、PBSで希釈した。遊離したペントシジンの濃度は、蛍光検出器(RF-10A、島津製作所)を用いた逆相HPLCを用いて測定した(Miyata, T. et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.93, p.2353-2358, 1996)。流出液を335/385nmの励起/発光波長でモニターした。合成ペントシジンを標準物質として使用した。ペントシジンの検出限界は、0.1pmol/mgタンパク質であった。

【0115】

抑制効果は、化合物TM2002と同様にして反応させた陽性対照(ピリドキサミン(シグマ))と比較することにより評価した。なお、アミノグアニジン、オルメサルタン、エダラボンについても、同様に抑制効果を調べた。結果(ペントシジン量nmol/ml)を、図1(図中、対照とあるのは、溶媒のみを使用した陰性対照を意味する。以下、同じ。)に示す。この結果から、TM2002が陽性対照のピリドキサミンに比較して有意にペントシジンの生成を抑制することが理解される。

【0116】

[試験例2] ヒドロキシラジカルによるフェニルアラニンのヒドロキシル化反応抑制効果
フェニルアラニン(最終濃度:1mM)、TM2002(最終濃度:0.1、0.5、2.5mM)、過酸化水素(最終濃度:5mM)、硫酸銅(最終濃度:0.1mM)を200mMのリン酸緩衝液(pH7.4)に溶解し(全量500μL)、37℃で4時間インキュベートした。インキュベート終了後、DTPA(最終濃度:1mM)、260unitのカタラーゼを添加して反応を停止させた。o-チロシンおよびm-チロシンの生成量をHPLCで分析した。

【0117】

すなわち、一定時間後、反応液を100倍希釈し20μLをHPLCにインジェクトし、C18カラム(4.6 x 250mm、5μm:野村化学製)で分離後、励起波長275nm、蛍光波長305nmの条件で蛍光検出器(RF-10A:島津製)を用いて検出した。移動相は、0.6mL/分の流速で、バッファB濃度を6.5%から10%まで25分間で変化させた(バッファA:0.10%トリフルオロ酢酸、バッファB:0.08%トリフルオロ酢酸を含む80%アセトニトリル)。結果を、アミノグアニジン、ピリドキサミンおよびオルメサルタンについて得られた結果とともに、図2および3に示す。

【0118】

〔試験例3〕パーオキシナイトライトによるチロシンのニトロ化反応の抑制効果

試験は、Pannala ASらの方法 (Free Radic Biol Med 24: 594-606, 1998) に準じて実施された。すなわち、チロシン (最終濃度: 100 μ M)、TM2002 (最終濃度: 0.1、0.5、2.5 mM)、パーオキシナイトライト (同仁化学製) (最終濃度: 500 μ M) を200 mMのリン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解し (液量500 μ L)、37℃で15分間インキュベートさせた。インキュベート終了後、ニトロチロシンの生成量をHPLCで分析した。すなわち、一定時間後、反応液 (20 μ L) をHPLCにインジェクトし、C18カラム (4.6 x 250mm、5 μ m: ウォーターズ製) で分離後、紫外検出器 (RF-10A: 島津製) を用い280 nmの波長で検出した。移動相は、0.6mL/分の流速で、バッファB濃度を5.0%から30%まで30分間で変化させた (バッファA: 0.10%トリフルオロ酢酸、バッファB: 0.08%トリフルオロ酢酸を含む80%アセトニトリル)。4-ヒドロキシ-3-ニトロ安息香酸 (100 μ M) を内部標準として使用した。結果を、アミノグアニジン、ピリドキサミン、オルメサルタンおよびエダラボンについて得られた結果とともに、図4に示す。

【0119】

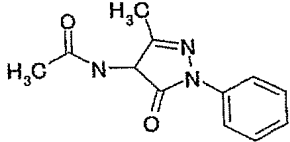
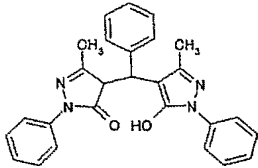
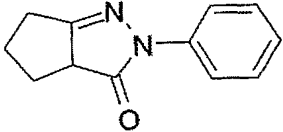
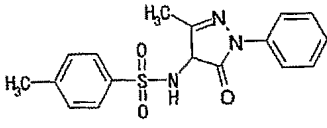
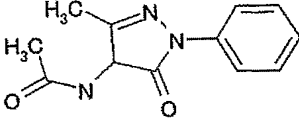
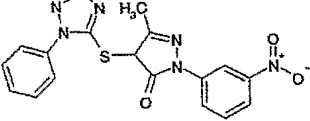
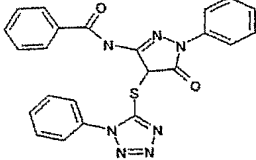
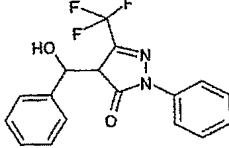
〔試験例4〕

患者血漿に代え、BSAとアラビノースとともにインキュベートする以外は、〔試験例1〕と同様にして、他の化合物 (I) または (II) のペントシジン生成抑制活性を調べた。結果は、表1に示すとおりであった。なお、「-」は、試験を行わなかったことを示す。

【表 1-1】

NO	化合物名 (Chemical name)	化学構造式	薬剤濃度 5mM でのペントシジ ン生成率 (%)
1	2-(3-アミノ-5-オキソ-1-フェニル -4,5-ヒドロ-1H-ピラゾール-4-イ ル)2-オキソ-N-フェニル-アセトアミ ド		-
2	2-(3-アミノ-5-オキソ-1-フェニル -4,5-ヒドロ-1H-ピラゾール-4-イ ル)2-オキソ-N-チアゾール-2-イル- アセトアミド		-
3	2-(3-アミノ-5-オキソ-1-フェニル -4,5-ヒドロ-1H-ピラゾール-4-イ ル)2-オキソ-アセトアミド		-
4	2-(3-アミノ-5-オキソ-1-フェニル -4,5-ヒドロ-1H-ピラゾール-4-イ ル)-N-(3,4-ジメチル-フェニル)-4- オキソ-ブチルアミド		-
5	2-(4-アミノ-フェニル)-4-(2-ヒドロキ シ-エチル)-5-メチル-2,4-ヒドロ-ピ ラゾール-3-オン		-
6	5-アミノ-2-フェニル-4-(1-フェニル -1H-テトラゾール-5-イル)スルファニ ル)-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オ ン		-
7	3-(3-メチル-5-オキソ-1-ペニル -4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-イ ル)-プロピオンickアシッド		64.64

【表 1-2】

NO	化合物名 (Chemical name)	化学構造式	薬剤濃度 5 mM でのペントシジン生成率 (%)
8	N-(3-メチル-5-オキソ-1-フェニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)-アセトアミド		-
9	4-[(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)-フェニル-メチル]-5-メチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		7.52
10	2-フェニル-3a,4,5,6-テトラヒドロ-2H-シクロペンタピラゾール-3-オン		-
11	4-メチル-N-(3-メチル-5-オキソ-1-フェニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)-ベンゼンスルホンアミド		-
12	N-(3-メチル-5-オキソ-1-フェニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)-アセトアミド		54.21
13	5-メチル-2-(3-ニトロ-フェニル)-4-(1-フェニル-1H-テトラゾール-5-イルスルファニール)-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		74.66
14	N-[5-オキソ-1-フェニル-4-(1-フェニル-1H-テトラゾール-5-イルスルファニール)-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-3-イル]-ベンズアミド		61.27
15	4-(ヒドロキシ-フェニル-メチル)-2-フェニル-5-トリフルオロメチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		-

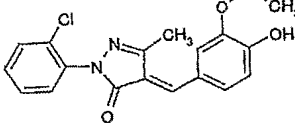
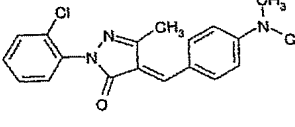
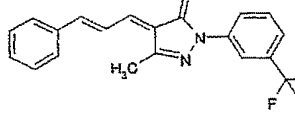
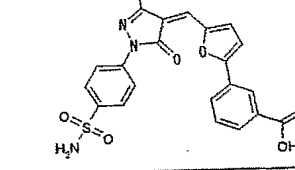
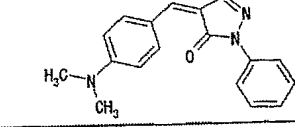
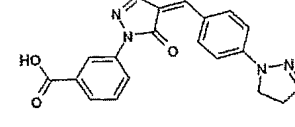
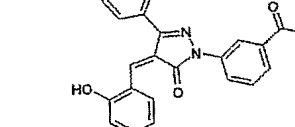
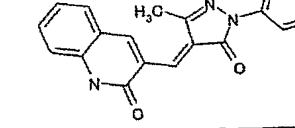
【表 1-3】

NO	化合物名 (Chemical name)	化学構造式	薬剤濃度 5 mM でのペントシジ ン生成率 (%)
16	4-(1-ヒドロキシイミノ-エチル)-2,5-ジフェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		-
17	5,5'-ジメチル-2,2'-ジフェニル-2,4,2',4'-テトラヒドロ-[4,4']ビ ピラゾール-3,3'-ジオン		60.96
18	2-(4-クロロ-フェニル)-4-エチル -5-メチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾ ール-3-オン		-
19	4-[4-(4-メトキシ-フェニル)-チア ゾール-2-イルスルファニール]-5- メチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ- ピラゾール-3-オン		40.19
20	4-(2-オキソ-2-フェニル-エチル)-2 フェニル-5-プロピル-2,4-ジヒドロ -ピラゾール-3-オン		83.12
21	5-メチル-2-フェニル-4-(4-p-トル イル-チアゾール-2-イルスルファニ ル)-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オ ン		42.07
22	2-(4-フルオロ-フェニル)-4-[[1-(4-フルオロ-フェニル)-5-ヒドロキシ-3-メチル-1H-ピ ラゾール-4-イル]-(2-ヒドロキシ- フェニル)-メチル]-5-メチル-2,4- ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		2.9

【表 1-4】

NO	化合物名 (Chemical name)	化学構造式	薬剤濃度 5mM でのペントシジン生成率 (%)
23	N-(3,4-ジメチル-フェニル)-2-(3-メチル-5-オキソ-1-フェニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)-2-オキソ-アセトアミド		-
24	5-(4-クロロ-ベンゾイル)-4,4-ジヒドロキシ-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		-
25	ナトリウム;4-ヒドロキシ-3-メチル-5-オキソ-1-フェニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-スルフォネイト		38.80
26	5-メチル-4,4-ジモルホリン-4-イル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		50.68
27	ナトリウム;3-ベンゾイルアミノ-4-ヒドロキシ-5-オキソ-1-フェニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-スルフォネイト		2.83
28	3-メチル-1-フェニル-5-オキソ-4-スビロ(3オキソ-2,3-ジヒドロ-ベンゾ[b]チオフェン-2-イル)-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール		22.83
29	4,4,5-トリメチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		-
30	4,10-ジメチル-2,8,11-トリフェニル-2,3,8,9-テトラザ-ジスピロ[4.0.4.1]ウンデカ-3,9-ジエン-1,7-ジオン		62.43

【表 1-5】

NO	化合物名 (Chemical name)	化学構造式	薬剤濃度 5mM でのペントシジ ン生成率 (%)
31	2-(2-クロロフェニル)-4-(3-エトキシ-4-ヒドロキシベンジリデン)-5-メチル-2,4-ジヒドロピラゾール-3-オン		15.57
32	2-(2-クロロフェニル)-4-(4-ジメチルアミノベンジリデン)-5-メチル-2,4-ジヒドロピラゾール-3-オン		8.7
33	5-メチル-4-(3-フェニルアリリデン)-2-(3-トリフルオロメチルフェニル)-2,4-ジヒドロピラゾール-3-オン		80.08
34	3-[5-[3-メチル-5-オキソ-1-(4-スルファモイルフェニル)-1,5-ジヒドロピラゾール-4-イリデンメチル]-フラン-2-イル]-ベンゾイックアシッド		-
35	4-(4-ジメチルアミノベンジリデン)-2-(3-フルオロフェニル)-5-メチル-2,4-ジヒドロピラゾール-3-オン		76.31
36	3-[4-[4-(3-クロロ-4,5-ジヒドロピラゾール-1-イル)-ベンジリデン]-3-メチル-5-オキソ-4,5-ジヒドロピラゾール-1-イル]-ベンゾイックアシッド		26.37
37	3-[4-(2-ヒドロキシベンジリデン)-5-オキソ-3-フェニル-4,5-ジヒドロピラゾール-1-イル]-ベンゾイックアシッド		0.02
38	3-[1-(3-クロロフェニル)-3-メチル-5-オキソ-1,5-ジヒドロピラゾール-4-イリデンメチル]-1H-キノリン-2-オン		84.95

【表 1-6】

NO	化合物名 (Chemical name)	化学構造式	薬剤濃度 5 mM でのペントシジ ン生成率 (%)
39	3-[5-[3-メチル-5-オキソ-1-(4-スルファモイル-フェニル)-1,5-ジヒドロ-ピラゾール-4-イリデンメチル]-フラン-2-イル]-ベンゾイックアシッド メチルエステル		16.87
40	4-(4-ベンゾ[1,3]ジオキソール-5-イルメチレン-3-メチル-5-オキソ-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル)-ベンゾイックアシッド メチルエステル		32.37
41	4-[3-メチル-5-オキソ-4-[5-(4-スルファモイル-フェニル)-フラン-2-イルメチレン]-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-ベンゾイックアシッド メチルエステル		37.81
42	2-(4-クロロ-フェニル)-4-(2,4-ジヒドロキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		68.32
43	2-(4-クロロ-フェニル)-4-(3-ヒドロキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2,4-ジヒドロピラゾール-3-オン		3.00
44	4-(3,4-ジヒドロキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2-p-トルイル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		66.19
45	3-[1-(4-アセチル-フェニル)-3-メチル-5-オキソ-1,5-ジヒドロ-ピラゾール-4-イリデン]-1,3-ジヒドロインドール-2-オン		19.22

【表 1-7】

NO	化合物名 (Chemical name)	化学構造式	薬剤濃度 5 mM でのペントシジン 生成率 (%)
46	2-(4-フルオロ-フェニル)-4-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1 <i>H</i> -ピラゾール-1-イルメチレン)-5-メチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		15.69
47	2-(4-クロロ-フェニル)-4-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ-ベンジリデン)-5-トリフルオロメチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		28.86
48	2-(4-エチル-フェニル)-4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		0.02
49	4-[4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-ベンゼンスルホンアミド		7.09
50	4-(5-オキソ-4-チオフェン-2-イルメチレン)-3-トリフルオロメチル-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル)-ベンゾイックアシッド エチルエステル		63.17
51	4-[4-(4-ジメチルアミノ-ベンジリデン)-5-オキソ-3-トリフルオロメチル-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-ベンゼンスルホンアミド		41.68
52	4-イソプロピリデン-5-メチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		-

【表 1-8】

NO	化合物名 (Chemical name)	化学構造式	薬剤濃度 5 mM でのペントシジン 生成率 (%)
53	4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-2-フェニル-5-トリフルオロメチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		66.76
54	4-(2,4-ジヒドロキシ-ベンジリデン)-2-(3,4-ジメチル-フェニル)-5-メチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		73.48
55	3-[4-(3-エトキシ-4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-ベンゾイックアシッド		-
56	4-[4-(3,5-ジターシャリーブチル-4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-ベンゾイックアシッド		-
57	3-[4-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-ベンゾイックアシッド		-
58	3-[3-ヒドロキシ-4-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ-ベンジリデン)-5-オキソ-ピラゾリジン-1-イル]ベンゾイックアシッド		0.07
59	4-(3-ヒドロキシ-2,4-ジメトキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		5.3
60	4-[4-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-ピラゾリジン-1-イル]-ベンゾイックアシッド イソプロピル エステル		9.02

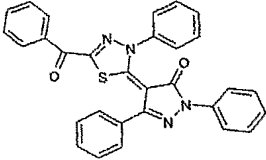
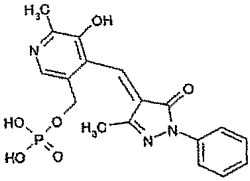
【表 1-9】

NO	化合物名 (Chemical name)	化学構造式	薬剤濃度 5 mM でのペントシジ ン生成率 (%)
61	2-クロロ-5-[4-(2-クロロ-4-ヒドロキシ-5-メトキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-ベンゾイックアシッド		46.25
62	4-[4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-ベンゾイックアシッド エチル エステル		-
63	4-[4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-5-オキソ-3-トリフルオロメチル-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-ベンゾイックアシッド エチル エステル		-
64	4-[4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-ベンゾイックアシッド		-
65	4-ジメチルアミノメチレン-5-メチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		62.43
66	4-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イルメチレン)-5-メチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		15.17
67	4-(4-クロロ-ベンジリデン)-5-メチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		9.09
68	1-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)-6-メチル-1,3-ジヒドロ-フロ[3,4-c]ピリジン-7-オール		2.82

【表 1-10】

NO	化合物名 (Chemical name)	化学構造式	薬剤濃度 5 mM でのペントシジ ン生成率 (%)
69	1-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル -1H-ピラゾール-4-イル)-6-メチル -1,3-ジヒドロ-フロ[3,4-c]ピリジン-7- オール; ハイドロクロリック アシッド ソ ルト		2.94
70	4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-5-メチ ル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾ ール-3-オン		0.04
71	2-(3-クロロ-フェニル)-4-(4-ヒドロキ シ-ベンジリデン)-5-メチル-2,4-ジヒド ロ-ピラゾール-3-オン		4.63
72	4-(4-ベンジルオキシ-ベンジリデン)-5- メチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラ ゾール-3-オン		7.63
73	2-(3-クロロ-フェニル)-5-メチル-2H-ピ ラゾール-3,4-ジオン 4-オキシム		66.42
74	5-(5-オキソ-1,3-ジフェニル-1,5-ジヒ ドロ-ピラゾール-4-イルイデン)-4-フェニ ル-4,5-ジヒドロ-[1,3,4]チアゾール-2- カーボキシリック アシッド エチル エ ステル		87.24
75	4-[1,3]ジチオラン-2-イリデン-5-メチ ル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾ ール-3-オン		-
76	5-(4-クロロ-フェニルスルファニルメチ ル)-2-フェニル-4-[N'-(3-トリフルオロ メチル-フェニル)-ヒドラジノ]-2,4-ジ ヒドロ-ピラゾール-3-オン		-

【表 1-11】

NO	化合物名 (Chemical name)	化学構造式	薬剤濃度 5 mM でのペントシジ ン生成率 (%)
77	4-(5-ベンゾイル-3-フェニル -3H-[1,3,4]チアジアゾール-2-イリ デン)-2,5-ジフェニル-2,4-ジヒドロ -ピラゾール-3-オン		-
78	フォスフォリックアシッド モノ-[5- ヒドロキシ-6-メチル-4-(3-メチル-5- オキソ-1-フェニル-1,5-ジヒドロ-ピ ラゾール-4-イリデンメチル)-ピリジ ン-3-イルメチル] エステル		-

【0120】

〔試験例 5〕 バルーン傷害モデルによる検討

血管拡張術後再狭窄モデルであるラット頸動脈バルーン傷害モデルによる、血管内皮肥厚の抑制効果を検討した。

TM2002 をカルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC) 水溶液 (0.5%) で乳鉢を用いて懸濁し、メスシリンダーで 12.5mg/mL の濃度に調製した。陽性対照としてアミノグアニジン塩酸塩 (シグマ) を用い、同様に CMC 水溶液 (0.5%) で乳鉢を用いて懸濁し、メスシリンダーで 11.25mg/mL の濃度に調製した。各調製液は用時調製してディスポーザブル注射筒および経口ゾンデを用いて懸濁させながら強制経口投与した。

【0121】

溶媒群 (n=10) は、CMC 水溶液 (0.5%) を 4 mL/kg/回、1 日 2 回経口投与した (8 mL/kg/day)。TM2002 (被試物質) 群 (n=10) は、1-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)-6-メチル-1,3-ジヒドロ-フロ[3,4-c]ピリジン-7-オール塩酸塩を 50mg/kg/回、1 日 2 回経口投与した (100mg/kg/day)。アミノグアニジン群 (n=10) は、アミノグアニジン塩酸塩を 45mg/kg/回、1 日 2 回経口投与した (90mg/kg/day)。

投与はバルーン傷害前日から開始し、傷害日を 1 日目として 14 日目までの合計 15 日間、1 日朝夕 2 回 6 時間以上の間隔をあけて投与した (バルーン傷害 15 日目に解剖、15 日目の投与は実施しない)。

【0122】

ラットは、9 週齢 (バルーン傷害時週齢: 10 週齢) の SD 系雄性ラット (日本エスエルシー) を用いた。試験動物の入荷時に各動物の健康状態を肉眼的に観察し、異常のない動物を動物室に収容した。入荷時より 6 日間以上予備飼育した後、一般状態の良好な個体を試験に用いた。ラットを 1 群 10 匹とし、投与開始前の体重をもとに溶媒群、被試物質群、アミノグアニジン群の 3 群に分けた。

【0123】

ペントバルビタールナトリウム (40mg/kg, i.p.) 麻酔下でラットの頸部および大腿部を切開し、左頸動脈および大腿動脈を露出する。大腿動脈に切開を加えバルーンカテーテル (2 Fr, フォガティカテーテル; バクスター) を挿入し、先端を左頸動脈の内外頸動脈分岐部まで導く。バルーンカテーテルが確実に頸動脈内にあることを目視で確認し、バルーン内に空気 (0.3mL) を注入してバルーンを膨らます。バルーンを膨らませたまま大動脈弓までバルーンカテーテルを引き抜く。この操作を 3 回繰り返し血管内膜に傷害を与える

。バルーンカテーテル抜去後、大腿動脈を結紮する。切開部を縫合し、傷口はイソジン液を用いて十分に消毒する。なお、右頸動脈には損傷を与えずに各個体の対照として用いる。

【0124】

試験中は毎日動物の生死及び手術部位の状態について観察を行う。また体重は傷害前日からバルーン傷害14日目まで1日1回測定する。体重から各個体の投与容量を算出した。

【0125】

バルーン傷害15日目にエーテル麻酔下で腹部大静脈から採血を行う。採血後、左頸動脈を摘出して3分割し、各セクションから約5mmを切り取り、右頸動脈を摘出して中央部から約5mmを切り取りそれぞれ10%中性緩衝ホルマリンで固定した。ホルマリン固定した頸動脈標本はパラフィンブロックを作製後、薄切しHE染色を行った。画像解析装置 (VM-30、オリンパス光学) で血管内腔面積、内弾性板で囲まれた面積および外弾性板で囲まれた面積を計測した。

【0126】

測定した面積をもとに血管の新生内膜面積、中膜面積及び新生内膜/中膜面積比を各切片 (3部位) について求めた。各個体で求めた3部位の平均値を用いて内膜肥厚を評価した。結果を図5 (A、BおよびC) に示す。この結果から、TM2002群は、陽性対照であるアミノグアニジン群に匹敵する血管内皮肥厚の抑制効果を示すことが理解される。

【0127】

〔試験例6〕 ビタミンB6との反応性の検討

ビタミンB6 (ピリドキサル-5'-リン酸) ($50\mu\text{M}$) とTM2002 ($0.5\mu\text{M}$) をリン酸塩緩衝食塩水 (PBS) 中、 37°C でインキュベートした。0~20時間の間でカイネティックスを測定するために、残存するピリドキサル-5'-リン酸濃度をHPLCで分析した。すなわち、一定時間後、 $10\mu\text{L}$ の反応液をHPLCにインジェクトし、Purecil C18カラム ($4.6 \times 250\text{mm}$ 、 $5\mu\text{m}$; ウォーターズ製) で分離後、励起波長 300nm 、蛍光波長 400nm の条件で蛍光検出器 (RF-10A: 島津製) を用いて検出した。移動相は、 0.6mL/L の流速で、バッファB濃度を0%から3%まで25分間で変化させた (バッファA: 0.10%トリフルオロ酢酸、バッファB: 0.08%トリフルオロ酢酸を含む80%アセトニトリル)。対照として、ビタミンB6捕捉作用が知られているアミノグアニジンを用いた。

【0128】

20時間後、TM2002群のピリドキサル-5'-リン酸残存率は97%であったのに対し、対照のアミノグアニジン群のピリドキサル-5'-リン酸残存率はわずか0.2%であり、TM2002がビタミンB6と反応しないことが示された。

なお、他の化合物 (I) および (II) もTM2002と同様の結果を示した。

【0129】

〔試験例7〕 ビタミンB6欠乏症抑制効果

正常ラット (WKYラット: 日本エスエルシー) にTM2002を投与し、ビタミンB6欠乏症の有無を検討した。対照として、ビタミンB6捕捉作用が知られているアミノグアニジンを用いた。動物数は、各群10匹とし、カルボキシメチルセルロース (0.5%) に懸濁したTM2002またはアミノグアニジンをおのおの 13mg/kg /匹/回の量でゾンデにより1日2回強制経口投与した。投与期間は、20週とした。餌は、一般餌 (CRF1: オリエンタル酵母) を用いた。

【0130】

20週後のWKYラットの形態を観察したところ、TM2002投与群においては、口角炎、口内炎、舌炎、口唇炎、急性および慢性湿疹、接触性皮膚炎、末梢神経炎、貧血、リンパ球減少症、神経障害などのビタミン欠乏に起因する症状はまったく認められず、正常な状態を保っていた。一方、アミノグアニジン投与群では、皮膚炎、癩癧および脳障害による痙攣を認めた。

なお、他の化合物 (I) および (II) もTM2002と同様の結果を示した。

【図面の簡単な説明】

【0131】

【図1】 ペントシジン生成に対する TM2002 の抑制効果を示す図。

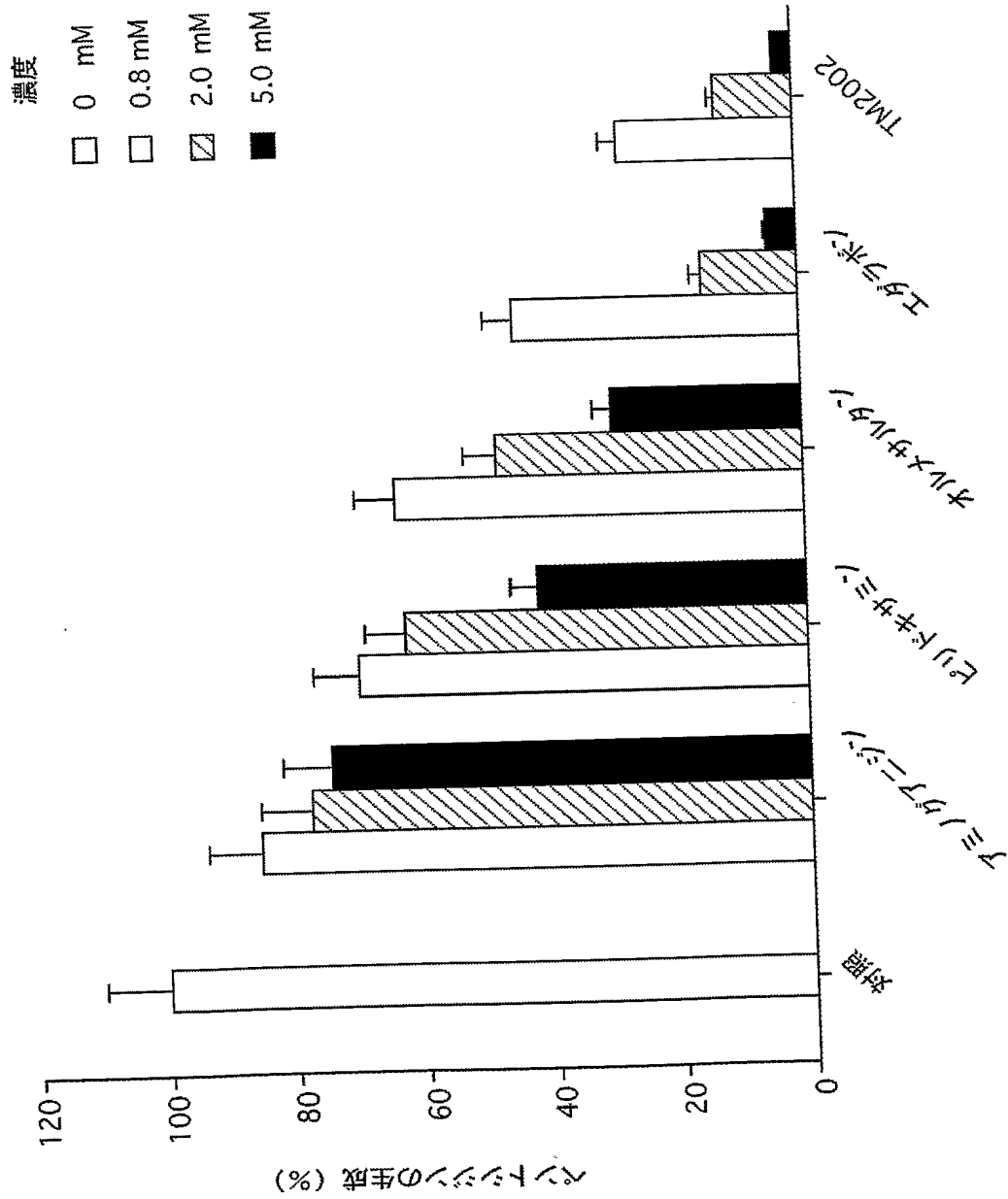
【図2】 ヒドロキシラジカルによるフェニルアラニンのヒドロキシル化反応に対する TM2002 の抑制効果（o-チロシン生成抑制を指標とする）を示す図。

【図3】 ヒドロキシラジカルによるフェニルアラニンのヒドロキシル化反応に対する TM2002 の抑制効果（m-チロシン生成抑制を指標とする）を示す図。

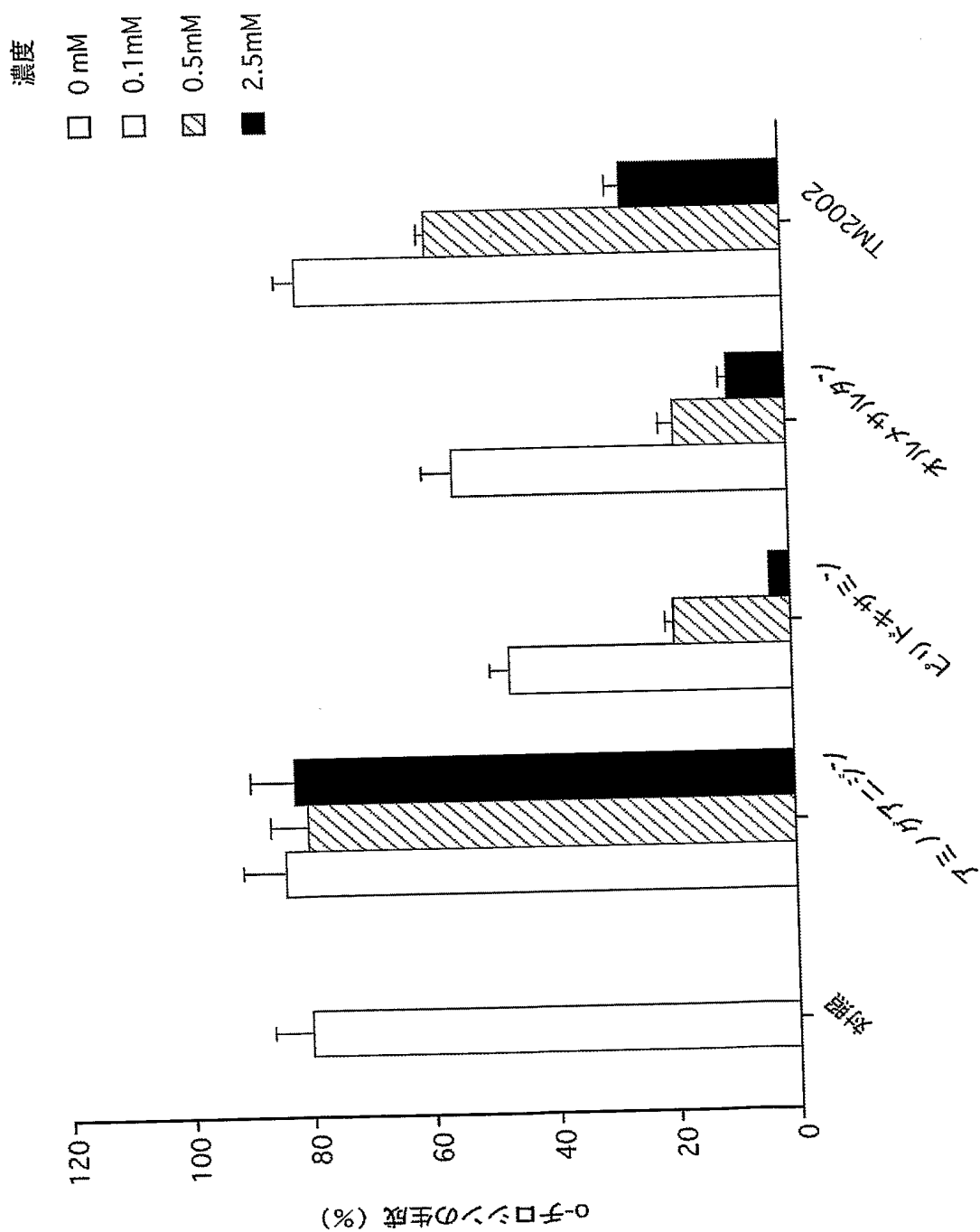
【図4】 パーオキシナイトライトによるチロシンのニトロ化反応に対する TM2002 の抑制効果を示す図。

【図5】 ラット頸動脈バルーン傷害モデル実験における TM2002 の血管内皮肥厚抑制効果を示す写真（Aは対照；Bは TM2002 50mg/kg 投与；Cはアミノグアニジン 45mg/kg 投与）。

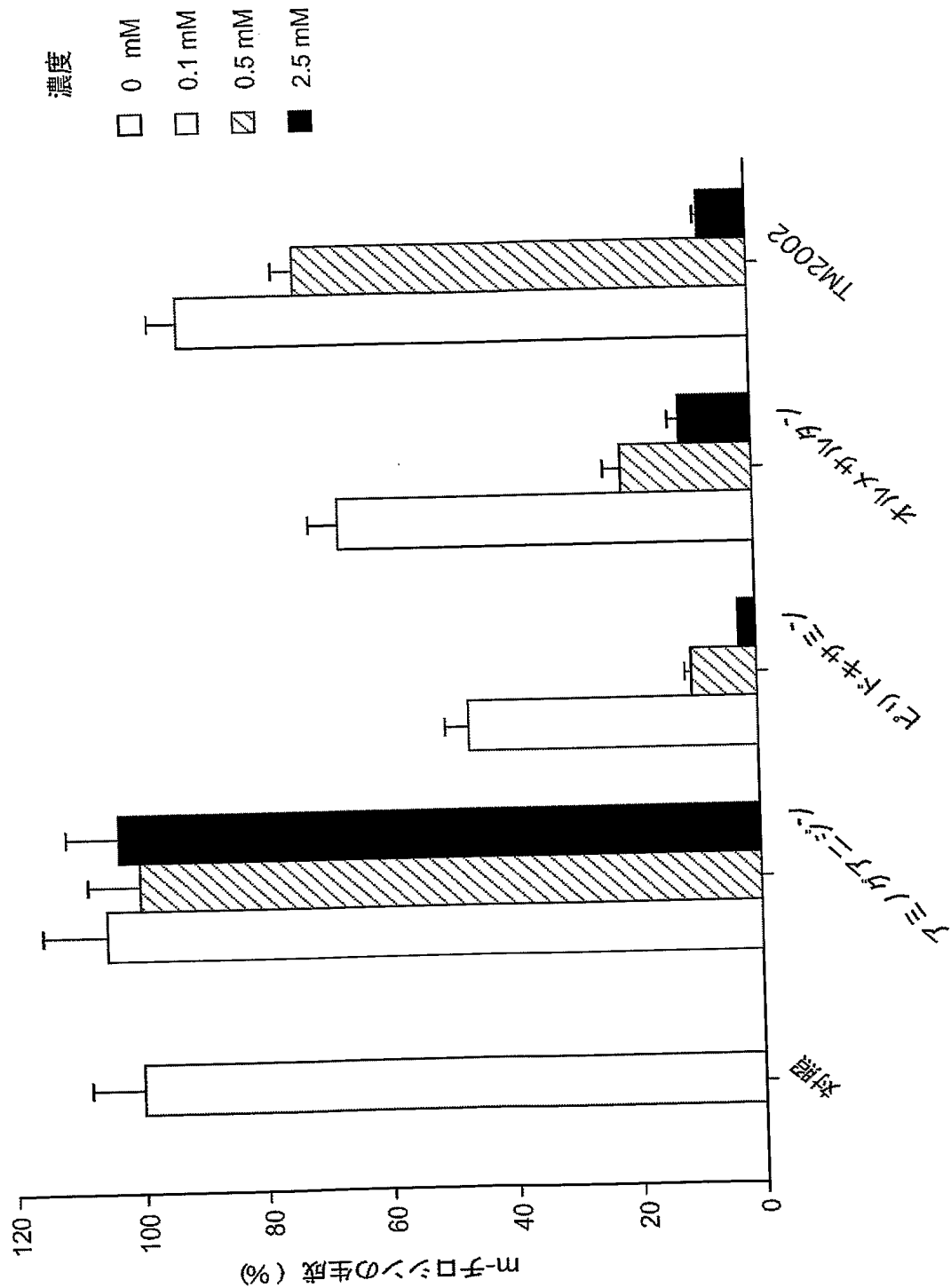
【書類名】 図面
【図 1】



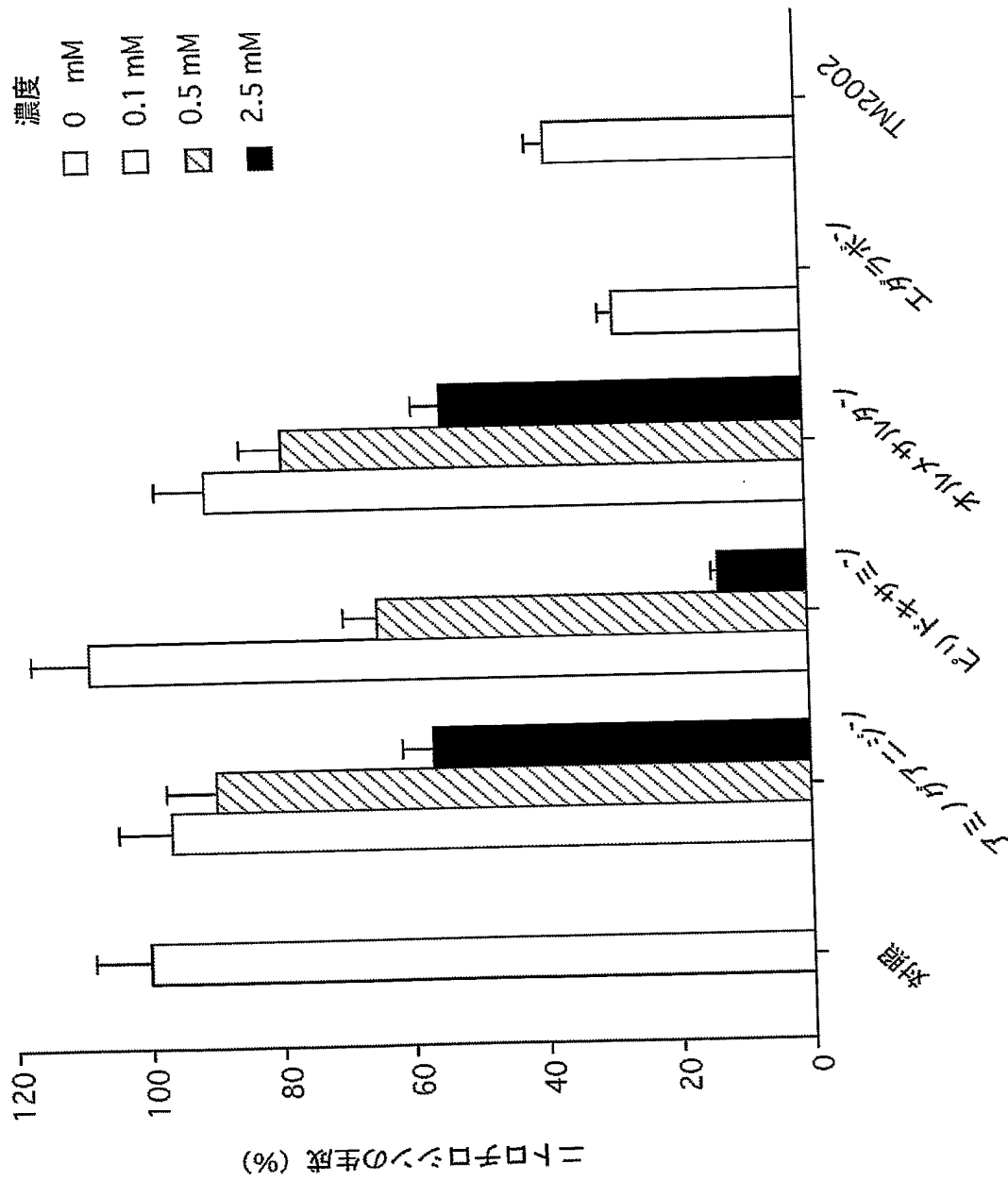
【図 2】



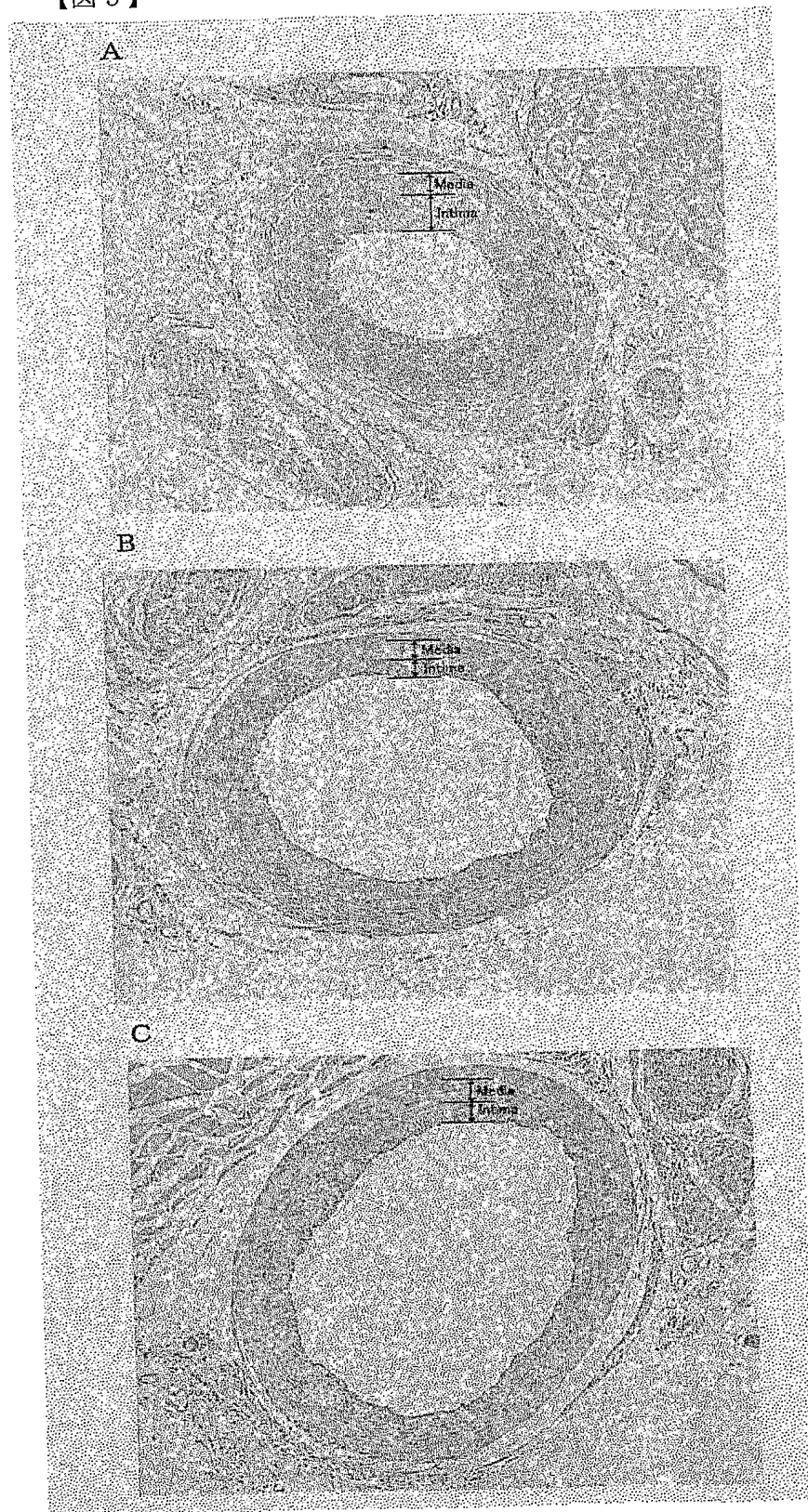
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

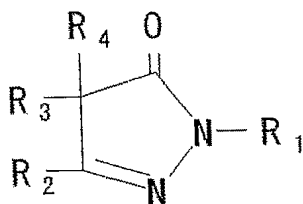
【課題】

副作用としてのビタミン B6 欠乏症が抑制された、蛋白修飾物生成抑制剤、特に腎保護剤を提供すること。

【解決手段】

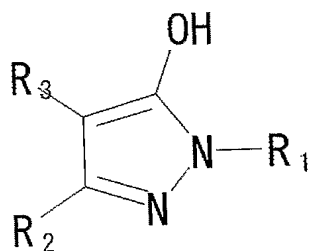
遊離形または塩形の、下記式 (I) または (II) の化合物を有効成分として使用すること：

【化 1】



または式 (II)：

【化 2】



〔式中、R₁は置換または非置換の芳香環基であり、R₂、R₃およびR₄はそれぞれ水素原子または1価の有機基であるか、またはR₂とR₃は両者合して縮合環を形成するか、もしくはR₃とR₄は両者合して2価の有機基を表す。ただし、R₃とR₄が共に水素原子であることはない。〕。

【選択図】 なし

特願 2003-407834

出願人履歴情報

識別番号

[000125369]

1. 変更年月日

1990年 8月27日

[変更理由]

新規登録

住所

東京都渋谷区富ヶ谷2丁目28番4号

氏名

学校法人東海大学

2. 変更年月日

2004年11月17日

[変更理由]

住所変更

住所

東京都渋谷区富ヶ谷2丁目28番4号

氏名

学校法人東海大学

特願 2 0 0 3 - 4 0 7 8 3 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 9 7 1 4 2 3 7 6]

1. 変更年月日

2 0 0 0 年 1 0 月 5 日

[変更理由]

住所変更

住 所

神奈川県伊勢原市桜台 2 丁目 1 6 - 2 5 エクセル伊勢原 1 0
2 号

氏 名

宮田 敏男

特願 2 0 0 3 - 4 0 7 8 3 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 9 7 1 4 2 3 8 7]

1. 変更年月日

1 9 9 7 年 9 月 2 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都新宿区市谷柳町 4 9 市ヶ谷ヒルズ 4 0 1

氏 名

黒川 清